

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**

**NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR**

**Participação do receptor de potencial transitório vanilóide do tipo  
1 (TRPV1) nas respostas termorregulatórias em ratos Wistar  
submetidos a estresse social**

**AUTORA: Thayane Oliveira Reis**

**Ouro Preto  
2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE FISIOLÓGIA CARDIOVASCULAR

**Participação do receptor de potencial transitório vanilóide do tipo  
1 (TRPV1) nas respostas termorregulatórias em ratos Wistar  
submetidos a estresse social.**

AUTORA: Thayane Oliveira Reis  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes  
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Ouro Preto  
2018

R277p

Reis, Thayane Oliveira .

Participação do receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1 (TRPV1) nas respostas termorregulatórias em ratos Wistar submetidos a estresse social [manuscrito] / Thayane Oliveira Reis. - 2018.

88f.: il.: color; grafs.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes.

Coorientador: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr..

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Febre. 2. Stress. 3. Ratos - Efeito da temperatura. I. Menezes, Rodrigo Cunha Alvim de. II. Chianca Jr., Deoclécio Alves . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.92/.93

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS**



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Aos 03 dias do mês de abril do ano de 2018, às 13:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Thayane Oliveira Reis, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes (Presidente - UFOP), pela Profa. Daniela Caldeira Costa Calsavara (Membro - UFOP), pelo Prof. Samuel Penna Wanner (Membro - Externo). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda Thayane Oliveira Reis 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Participação do Receptor de Potencial Transitório Vanilóide do Tipo 1 (Trpv1) Nas Respostas Termorregulatórias em Ratos Wistar Submetidos a Estresse Social", na área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos, para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro, Prof. Samuel Penna Wanner; segundo, Profa. Daniela Caldeira Costa Calsavara; terceiro, Prof. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 03 de abril de 2018.

Presidente: \_\_\_\_\_

*Rodrigo Cunha Alvim de Menezes*

Membro: \_\_\_\_\_

*Samuel Penna Wanner*

Membro: \_\_\_\_\_

*Daniela Caldeira Costa Calsavara*

Mestrando: \_\_\_\_\_

*Thayne*

## ***APOIO FINANCEIRO***

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular** do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade de Ouro Preto, com auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

## ***DEDICATÓRIA***

A Deus por estar presente em cada momento,  
a minha família por todo apoio e confiança  
e ao meu namorado Rérison por existir e  
me apoiar tanto para que eu continuasse na  
busca pelos meus ideais.

## ***AGRADECIMENTO ESPECIAL***

Ao meu professor e orientador Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes por ter me concedido a oportunidade de trabalhar novamente sobre sua orientação, e também por toda a sua dedicação, paciência, ajuda e por acreditar no meu trabalho me dando seu voto de confiança. Confiança esta, que sem dúvida, foi uma alavanca para que eu realizasse este trabalho com tanta garra. Ao meu co-orientador Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior pela vaga inicialmente cedida no início do mestrado, me dando a oportunidade de estar aqui novamente e também pelo acolhimento no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (LFC), convivência e apoio sempre.

## ***AGRADECIMENTOS***

A Deus por estar sempre presente em minha vida, me guiando e protegendo durante toda a minha jornada, e por me permitir concretizar este trabalho mesmo com tantos obstáculos no caminho.

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim, por sempre me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos e por muitas vezes me acalmarem nas situações de desespero e me ensinarem sempre a aprender e amadurecer com os problemas.

À minha irmã Nayana, por ser a pessoa que mais vibra comigo em cada vitória e me incentiva a ir atrás dos meus sonhos e não desistir mesmo com tantas dificuldades, você é a responsável por me fazer acreditar que não existe limite para quem quer crescer.

Ao meu namorado Rérisson pelo amor, pela paciência, compreensão, companheirismo, por se fazer presente mesmo longe e por sempre me incentivar e acreditar nos meus sonhos e me fazer acreditar que tudo vai dar certo. Te amo muito!!!

A Ana Catharina pela amizade, boas risadas, paciência e fazer a nossa convivência ser tão leve e divertida.

As minhas amigas e amigos que o MBA em Farmácia Estética me deu, por me escutar e me incentivar sempre, por terem paciência quando estava muito cansada e não queria conversar e por várias vezes não me deixarem desistir, saibam que vocês foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

A minha eterna chefinha Aline Rezende, por cada palavra de incentivo, por cada chamada de vídeo para desabafar, por cada conhecimento passado e tempo dedicado a mim, mesmo estando tão longe. Obrigada pela sua amizade e confiança em mim sempre.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Vascular. Saibam que cada um de vocês foi especial de uma forma diferente. Laura chegou quase no final, mas como você foi importante nessa reta final, cada palavra de ânimo e conforto me fizeram sim mais forte neste período, suas correções sempre com tanta atenção e enriquecendo com “palavras bonitas”. A Mariana (Mariane) por ter paciência em me ouvir e sempre estar disponível para momentos de distração, sem todas aquelas gordices, pode ser que estaria mais magra, mas não estaria tão bem. A Máira (Mária), sempre muito pratica e com seu jeitinho super sincero, sempre me mostrando as reais situações e não me deixando desistir. A Fernanda, acho que não conheço alguém tão dedicada e solícita, mesmo estando em uma fase tão nova em sua vida, sempre se preocupou em saber como eu estava, muito obrigada por todo



carinho. Glenda e Sylvana vocês foram para o intercambio pouco depois que comecei meu mestrado, senti muita falta de vocês, mas sei que estão aprendendo muita coisa nova para trazer para gente. Luiz, muito obrigada pelas risadas e por todas as boas discussões durante os dias que estava no laboratório. Paulo, muito obrigada pelo conhecimento passado e pela paciência com meus momentos de desespero. Vocês foram meu porto seguro nos momentos em que achei que não conseguiria, nos momentos de desespero, nos dias de TPM. O apoio de vocês foi essencial, sem vocês tudo seria muito mais difícil.

Aos Professores da banca, professora Daniela Caldeira Costa e professor Samuel Penna Wanner pelo interesse e disponibilidade em estar presente neste dia.

Aos professores, colegas da pós-graduação, demais membros do NUPEB pelo conhecimento compartilhado, convivência e aprendizado.

Ao Centro de Ciência Animal da UFOP por garantir o fornecimento de animais com tanta competência e por sempre fazer o impossível para nos auxiliar.

Aos funcionários Milton e Marli por toda ajuda durante esta caminhada, pela amizade, carinho, dedicação e paciência que tanto contribuíram para a concretização desse trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para que esta etapa fosse concluída. Muito obrigada!!!!

*“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem.  
Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”*

**Walter S. Landor**

*“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem  
‘Por quê?’  
Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo  
‘Por que não?’”*

**George Bernard Shaw**

# SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Hipertermia de estresse .....	1
1.2 Tecido adiposo marrom e temperatura.....	3
1.3 Receptor de Potencial Transitório (TRP).....	5
1.4 Receptor de Potencial Transitório Vanilóide -1 (TRPV1) .....	9
1.5 Resiniferatoxina .....	14
<b>2 – JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>19</b>
<b>3 - OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 - Objetivo Geral: .....	20
3.2 - Objetivos Específicos:.....	20
<b>4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 - Modelo Animal.....	21
4.2 - Delineamento Experimental.....	21
4.3 - Preparo de drogas/substâncias utilizadas .....	22
4.4 - Confecção de materiais utilizados .....	24
4.5- Cirurgia.....	25
4.5.1 - Implante de sensores de Temperatura e FC .....	25
4.6 - Cuidados pós-operatórios .....	27
4.7 – Procedimento de Injeção Intraperitoneal (i.p.) .....	27
4.8 - Registro do parâmetro cardiovascular de frequência cardíaca (FC) .....	28
4.9 - Registro dos parâmetros fisiológicos de temperatura corporal interna (TCO) e temperatura do tecido adiposo marrom (TAM) .....	28
4.10 - Registro de temperatura da cauda e região interescapular dorsal através de fotos Infravermelho.....	29
4.11 – Protocolo estresse por rato intruso. ....	29
4.10 - Procedimentos Histológicos .....	30
4.11 - Análises dos dados .....	31
4.12 - Análises Estatísticas .....	31
<b>5 - RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
5.1 - Efeitos da dessensibilização dos receptores TRPV1 por RTX no controle cardiovascular de animais expostos ao estresse social .....	32
5.2 - Efeitos da dessensibilização dos receptores TRPV1 por RTX no controle da temperatura TAM de animais expostos ao estresse social.....	36
5.3 - Efeitos da dessensibilização dos receptores TRPV1 por RTX no controle da TCO de animais expostos ao estresse social.....	39
5.4 – Efeitos da dessensibilização dos receptores TRPV1 por RTX no controle da temperatura da cauda de animais expostos ao estresse social .....	43

5.5 – Efeitos da dessensibilização dos receptores TRPV1 por RTX no controle da temperatura do dorso de animais expostos ao estresse social.....	46
<b>6 - DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>7 - CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático da distribuição do tecido adiposo marrom no corpo do rato.	4
Figura 2: Desenhos esquemáticos e representativos do tecido adiposo marrom interscapular de ratos Wild-tipe. Adaptado de Baron et al., 2012.	5
Figura 3: Representação esquemática do canal TRP.	6
Figura 4: Subfamílias TRPs.	7
Figura 5: Filogenia da superfamília dos canais de TRP.	8
Figura 6: Representação da estrutura de um monômero destacando seus seis segmentos transmembranares na formação de um canal TRP e também as possíveis formações de tetrâmeros (Homo- ou Hetero-).	11
Figura 7: Estrutura do receptor TRPV1.	12
Figura 8: Estrutura química da capsaicina e resiniferatoxina destacando o grupamento homovanilínico que confere atividade biológica análoga entre as substâncias.	15
Figura 9: Modelo esquemático do canal de TRPV1 juntamente com seus resíduos chaves e aminoácidos envolvidos na função de gating produzido por diferentes estímulos.	16
Figura 10: Modelo esquemático de ativação e dessensibilização causada pelo RTX nos canais TRPV1.	17
Figura 11: Esquema ilustrativo do delineamento amostral.	22
Figura 12: Imagem ilustrando o modelo do termistor utilizado para confecção dos sensores e suas respectivas ligações para FC, TCO e TAM.	25
Figura 13: Desenho esquemático do procedimento de estresse social por rato intruso.	30
Figura 14: Níveis de FC (bpm) antes, durante (entre linhas tracejadas) e após o estresse. (A) Representa os diferentes valores de FC entre os animais RTX controle e Veículo Controle. (B) Representa os diferentes valores de FC entre os animais RTX estresse e Veículo Estresse. Os símbolos representam média $\pm$ EPM. * Diferença estatística do grupo RTX em relação ao grupo veículo, Anova two way, com pós-teste Sidak ( $p < 0,05$ ).	33
Figura 15: Alterações na FC (bpm) evocadas pelo estresse social em ratos controle e dessensibilizados por RTX. (A) Delta do valor de maior variação de FC durante o estresse em relação aos 4 minutos pré-estresse. (B) Delta do maior valor de FC pós-estresse em relação aos 4 minutos iniciais pré-estresse. * Diferença estatística do grupo RTX em relação ao grupo veículo controle. # Diferença estatística do grupo RTX estresse em relação ao RTX controle. & Diferença estatística do grupo RTX estresse em relação ao veículo estresse. Anova two way, com pós-teste Sidak ( $p < 0,05$ ).	35
Figura 16: Alterações nos valores de temperatura do TAM ( $^{\circ}\text{C}$ ) antes, durante (linha tracejada) e após o estresse social. (A) Representa os diferentes valores de temperatura do TAM entre os animais RTX controle e Veículo controle. (B) Representa os diferentes valores de temperatura do TAM entre os animais RTX estresse e Veículo estresse. Os símbolos representam média $\pm$ EPM. * Diferença estatística do grupo RTX em relação ao Veículo. Anova two way, com pós-teste Sidak ( $p < 0,05$ ).	37
Figura 17: Alterações na temperatura do TAM ( $^{\circ}\text{C}$ ) evocadas pelo estresse social em ratos controle e dessensibilizados por RTX. (A) Delta do valor de maior variação da temperatura do TAM durante o estresse em relação aos 4 minutos pré-estresse. (B) Delta do maior valor de temperatura do TAM pós-estresse em relação aos 4 minutos iniciais pré-estresse. * Diferença estatística do grupo RTX em relação ao grupo veículo controle. # Diferença estatística do grupo RTX estresse em relação ao RTX controle. & Diferença estatística do	

grupo RTX estresse em relação ao veículo estresse. Anova two way, com pós-teste Sidak ( $p < 0,05$ ). .....38

**Figura 18:** Alterações nos valores de TCO ( $^{\circ}\text{C}$ ) antes, durante (linha tracejada) e após o estresse social. (A) Representa os diferentes valores de TCO entre os animais RTX controle e Veículo controle. (B) Representa os diferentes valores de TCO entre os animais RTX estresse e Veículo estresse. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. \* Diferença estatística do grupo RTX em relação ao Veículo. Anova two way, com pós-teste Sidak ( $p < 0,05$ ). .....40

**Figura 19:** Alterações na TCO ( $^{\circ}\text{C}$ ) evocadas pelo estresse social em ratos controle e dessensibilizados por RTX. (A) Delta do valor de maior variação da TCO durante o estresse em relação aos 4 minutos pré-estresse. (B) Delta do maior valor da TCO pós-estresse em relação aos 4 minutos iniciais pré-estresse. \* Diferença estatística do grupo RTX em relação ao grupo veículo controle. # Diferença estatística do grupo RTX estresse em relação ao RTX controle. & Diferença estatística do grupo RTX estresse em relação ao veículo estresse. Anova two way, com pós-teste Sidak ( $p < 0,05$ ). .....42

**Figura 20:** Efeito da dessensibilização de TRPV1, através da administração i.p. de RTX, na temperatura da cauda dos animais RTX controle, não submetidos ao estresse. (A) Valores de temperatura de cauda ( $^{\circ}\text{C}$ ) antes, durante (linha tracejada) e após nos animais não submetidos ao estresse social. (B) Representa os valores de temperatura de cauda dos animais RTX controle. (C) Representa os valores de temperatura de cauda nos animais veículo controle. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. As imagens infravermelho referem-se a animais representativos dos grupos RTX controle e Veículo Controle durante os experimentos. Nas imagens infravermelho, a cruz que está na foto indica o local de mensuração de temperatura (descrita no canto superior esquerdo da foto) naquele momento. ....44

**Figura 21:** Efeito da dessensibilização de TRPV1, através da administração i.p. de RTX, na temperatura da cauda dos animais RTX estresse, submetidos ao estresse. (A) Valores de temperatura de cauda ( $^{\circ}\text{C}$ ) antes, durante (linha tracejada) e após nos animais RTX estresse e Veículo estresse, submetidos ao estresse social. (B) Representa os valores de temperatura de cauda dos animais RTX estresse. (C) Representa os valores de temperatura de cauda dos animais Veículo estresse. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. As imagens infravermelho referem-se a animais representativos dos grupos RTX estresse e Veículo estresse durante os experimentos. \* Diferença estatística do grupo RTX em relação ao Veículo. Anova two way, com pós-teste Sidak ( $p < 0,05$ ). Nas imagens infravermelho, a cruz que está na foto indica o local de mensuração de temperatura (descrita no canto superior esquerdo da foto) naquele momento. ....45

**Figura 22:** Efeito da dessensibilização de TRPV1, através da administração i.p. de RTX, na temperatura do dorso dos animais RTX controle, não submetidos ao estresse. (A) Valores de temperatura do dorso ( $^{\circ}\text{C}$ ) antes, durante (linha tracejada) e após nos animais não submetidos ao estresse social. (B) Representa os valores de temperatura do dorso dos animais RTX controle. (C) Representa os valores de temperatura do dorso nos animais veículo controle. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. As imagens infravermelho referem-se a animais representativos dos grupos RTX controle e Veículo Controle durante os experimentos. \* Diferença estatística do grupo RTX em relação ao Veículo. Anova two way, com pós-teste Sidak ( $p < 0,05$ ). Nas imagens infravermelho, a cruz que está na foto indica o local de mensuração de temperatura (descrita no canto superior esquerdo da foto) naquele momento. ....47

**Figura 23:** Efeito da dessensibilização de TRPV1, através da administração i.p. de RTX, na temperatura do dorso dos animais RTX estresse, submetidos ao estresse. (A) Valores de temperatura do dorso ( $^{\circ}\text{C}$ ) antes, durante (linha tracejada) e após nos animais RTX estresse e Veículo estresse, submetidos ao estresse social. (B) Representa os valores de temperatura do dorso dos animais RTX estresse. (C) Representa os valores de temperatura do dorso dos animais Veículo estresse. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. As imagens infravermelho

**referem-se a animais representativos dos grupos RTX estresse e Veículo estresse durante os experimentos. Nas imagens infravermelho, a cruz que está na foto indica o local de mensuração de temperatura (descrita no canto superior esquerdo da foto) naquele momento.**  
.....48

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adenocorticotropico
CaM	Calmodulina
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
DRG	Gânglio da raiz dorsal
FC	Frequência Cardíaca
ip.	Injeção intraperitoneal
IUPHAR	União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica
Mg <sup>2+</sup>	Magnésio
Na <sup>+</sup>	Sódio
NADA	N- araquidonoildopamina
PA	Pressão Arterial
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
RC	RTX controle
RE	RTX estresse
RTX	Resiniferatoxina
SNC	Sistema nervoso central
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TCO	Temperatura Corporal
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPA	Receptor de potencial transitório de anquirina
TRPC	Receptor de potencial transitório canônico
TRPM	Receptor de potencial transitório melastatina
TRPML	Receptor de potencial transitório mucolipina
TRPP	Receptor de potencial transitório de polistina
TRPV	Receptor de potencial transitório vanilóide
VC	Veículo controle
VE	Veículo estresse
vMPFC	Córtex pré-frontal ventromedial



## RESUMO:

A palavra estresse refere-se ao esforço da adaptação do organismo diante situações que são consideradas ameaçadoras à vida e ao equilíbrio interno. As respostas que o sistema nervoso central dos mamíferos produz durante o estresse envolvem aumento da concentração plasmática do hormônio adrenocorticotropico (ACTH), da pressão arterial (PA), da frequência cardíaca (FC), da temperatura do tecido adiposo marrom (TAM) e da temperatura corporal (TCO). Em ratos, as respostas fisiológicas para as situações marcantes incluem um aumento da temperatura corporal, que pode ser chamado de “hipertermia induzida por estresse”, que é mediada por uma combinação de termogênese do TAM e a vasoconstrição da artéria caudal. A temperatura dos tecidos periféricos é regulada e sincronizada por vias indiretas, pelos canais TRPV1, os quais atuam como mediadores na regulação da temperatura. O presente estudo é focado no canal TRPV1, um importante receptor de canal iônico pertencente à família TRP. Deste modo, objetivamos avaliar o papel do receptor TRPV1 periférico nas respostas cardíacas e termorregulatórias em situações de estresse social por rato intruso. Para tal, foram implantados nos animais sensores de FC e de temperatura e, após 24 horas, foi feito nos mesmos o protocolo de dessensibilização do TRPV1 com RTX (resiniferatoxina). As respostas cardíacas e termorregulatórias foram avaliadas após 7 dias durante o protocolo de indução de estresse social por rato intruso. Nossos resultados demonstraram que o estresse causou taquicardia, aumento na temperatura corporal e na temperatura do TAM nos animais veículo e dessensibilizados. Porém, após o período de estresse, a FC e as temperaturas corporal e do TAM não retornaram aos valores basais nos animais dessensibilizados. Observamos também que a dessensibilização do TRPV1, por si só, foi capaz de aumentar a temperatura do TAM e do dorso durante condições de repouso. Além disso, demonstramos que a dessensibilização dos canais TRPV1 diminuiu a temperatura caudal durante o período de estresse, ao contrário do grupo veículo, o qual aumentou a temperatura caudal durante estresse. Estes resultados mostraram que os animais dessensibilizados para TRPV1 com RTX, não recuperam seus valores basais de FC e temperatura após período de estresse. Assim, nosso estudo sugere que o TRPV1 é um importante receptor para a recuperação da temperatura após um período de estresse.

## **ABSTRACT:**

The stress word refers to the organism's adaptation effort when facing life and internal balance threatening situations. The mammals central neural system's response during stress involves increasing adrenocorticotrophic hormone (ACTH) plasma concentration, blood pressure (BP) and heart rate (HR). Rats' physiological response to threatening situations also includes increasing body temperature, which is called "stress-induced hyperthermia", mediated by a combination of brown adipose tissue (BAT) thermogenesis and caudal artery vasoconstriction. Peripheral tissues temperature is regulated and synchronized by indirect pathways by the TRPV channels, which act as a temperature regulation mediator. The present study is focused on the TRPV1 channel, an important ionic channel receptor that belongs to TRP family. Thus, we aimed to evaluate the role of peripheral TRPV1 on thermoregulatory and cardiac responses caused social stress, by intrusive rat situations. Animals were implanted with HR and temperature sensors, and after 24 hours, they went through a TRPV1 desensitization protocol using RTX (nome da toxina). Cardiac and thermoregulatory responses were evaluated after 7 days during social stress induced by an intrusive rat protocol. Our results demonstrated that stress caused tachycardia, body temperature and BAT temperature increase in the vehicle and desensitized rats. After the stress period HR, body and BAT temperature did not return to baseline levels in the desensitized animals. We also observed that TRPV1 desensitization by itself was capable increase TAM and animals' back temperature during resting conditions. Furthermore, we demonstrated that channels TRPV1 desensitization lowered caudal temperature during stress period, contrary to the vehicle group, which increased caudal temperature during stress. Those results showed that animals desensitized for TRPV1 with RTX do not recover their baseline HR and temperature values after the stress period. Thus, our study suggests that TRPV1 is an important receptor to temperature recovery after a stress period.

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 Hipertermia de estresse

A palavra estresse remete ao esforço da adaptação do organismo em enfrentar situações que são consideradas ameaçadoras à vida e ao equilíbrio interno (CANNON, 1929). Selye propõe a teoria da síndrome de adaptação geral, conhecida como estresse (SELYE, 1936). O estresse pode ser definido como um estado de tensão que leva a uma ruptura no equilíbrio interno do organismo, este desequilíbrio geralmente pode ocorrer quando a pessoa necessita responder a alguma situação onde ultrapassa sua capacidade de adaptação (EVERLY, 1990). Segundo Cannon (1929) o responsável por toda essa restauração da homeostase após a perturbação pelo estímulo estressante seria o sistema nervoso autônomo simpático (CANNON, 1929).

As respostas que o sistema nervoso central dos mamíferos produz durante o estresse envolvem aumento da concentração plasmática do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), da pressão arterial (PA), da frequência cardíaca (FC), da temperatura do tecido adiposo marrom e da temperatura corporal (TCO) (STOTZ-POTTER et al., 1996a; STOTZ-POTTER et al., 1996b; DE MENEZES et al., 2008; OOTSUKA et al., 2008), e também acompanhadas de comportamentos defensivos como, fuga, congelamento, ataque defensivo e avaliação de risco (BLANCHARD et al., 1989 a; b). Estudos de Clark (1997) reconhecem o estresse como um mecanismo necessário para aumentar a chance de sobrevivência dos mamíferos (CLARK et al., 1997). Nos dias atuais a vida em sociedade tem nos propiciado diversas situações de estresse, exigindo uma constante ativação das vias neuronais e dos sistemas compensatórios de adaptação (Chrousos, 2009; Szczepanska-Sadowska, 2008).

Existem várias formas de estresse, porém os dois tipos principais são o estresse físico; caracterizado como uma ameaça direta ao organismo, e o estresse psicoemocional; que necessita da participação de várias estruturas cerebrais para ser interpretado (MAYOROW, 2011). Bjorkqvist (2001) constatou em seu estudo que os estressores de origem psicológica e social são mais comuns no ser humano.

A disputa para sobrevivência e reprodução em mamíferos possui um papel importante no contexto sexual e definição de território, principalmente entre machos. A

definição de território pode se manifestar principalmente por meio de reações agressivas onde se destaca um dominante e um perdedor segundo estudos de Krebs e cols. (1996). Um modelo conhecido para estudo do estresse social em animais é conhecido como interação residente- intruso, onde um macho adulto (intruso) é introduzido na caixa de um animal não familiar e agressivo (residente). Esta situação gera comportamentos agressivos no residente e comportamentos defensivos, como congelamento, no intruso, sendo esta uma situação de estresse agudo (KOOLHASS et al., 1997; MOTTA et al., 2009). O modelo de novidade social utilizado por Mesquita (2016) foi adaptado a partir dos estudos de Keeney (2006) e Mohammed (2014), nestes estudos os animais experimentais eram os animais residentes. Já no modelo de Mesquita (2016) o animal experimental era o animal intruso na situação, enquanto o animal residente está dentro de uma gaiola com grade. Este modelo de estresse é interessante pois é possível isolar os tipos de estímulos, ocorrendo neste caso somente o estresse emocional por não existir estímulo físico (MESQUITA et al, 2016; KEENEY et al., 2006; MOHAMMED et al., 2014).

Durante o estresse, a mudança na distribuição do fluxo sanguíneo pode ocorrer em várias partes do corpo, como por exemplo na pele (VIANNA e CARRIVE, 2005). A partir da ideia exposta por Blessing em 1999, foi realizado em 2005 o primeiro estudo para investigar as alterações do fluxo sanguíneo na pele durante situações de medo em ratos, onde observaram que os ratos utilizados apresentavam vasoconstrição na orelha e cauda durante o estímulo de alerta, sugerindo assim que esta vasoconstrição poderia ser generalizada (VIANNA e CARRIVE, 2005).

A temperatura interna em mamíferos pode sofrer variação quando expostos em situações marcantes, emocionalmente significativas, sendo situações relevantes para a sobrevivência do indivíduo (BLUMBERG et al., 1978; CABANAC, 2000; HETEM et al., 2013; LKHAGVASUREN et al., 2011). Em ratos, as respostas fisiológicas para as situações marcantes incluem um aumento da temperatura interna, que pode ser chamado de “hipertermia induzida por estresse”, que é mediada por uma combinação de termogênese do tecido adiposo marrom e a vasoconstrição da artéria caudal (MOHAMMED et al., 2013; KATAOKA et al., 2016; NAKAMURA et al., 2015; BLESSING et al., 2016).

Os aumentos na temperatura corporal facilitam o funcionamento do músculo cardíaco e esquelético (BENNETT, 1985), enquanto que o aumento na temperatura cerebral pode ser importante para suas funções intrínsecas (BLESSING et al, 2013). Estudos de Blessing (2013) sugerem que os aumentos na temperatura cerebral podem facilitar as sinapses de processos cognitivos associados com a exploração do ambiente.

Temperaturas elevadas além dos valores fisiológicos considerados normais facilitam o ritmo de exploração do ambiente, porque os neurónios do hipocampo expressam receptores potencial transiente vanilóide tipo 4 (TRPV4), e a ativação destes receptores são mediadas pelos aumentos fisiológicos na temperatura do cérebro de excitabilidade neuronal (SHIBASAKI et al., 2007; SHIBASAKI et al., 2013).

As formas pelos quais ocorre o aumento de temperatura (hipertermia por estresse) podem ser pela redução na perda de calor, ou pelo aumento na produção de calor, sendo que a maneira mais eficaz de reduzir a perda de calor é por meio da vasoconstrição (GORDON, 1990). Uma possibilidade para a redução da perda de calor pode ocorrer devido a um aumento intenso na vasoconstrição nos pés e na cauda, outra possibilidade está relacionada ao tecido adiposo marrom, pois este tecido é tido como uma fonte da hipertermia observada durante o estresse por imobilização (GAO et al, 2003; MARKS et al, 2009).

## **1.2 Tecido adiposo marrom e temperatura**

O tecido adiposo marrom (TAM) é relativamente novo quando se fala no contexto científico, aproximadamente 50 anos, quando foi demonstrado por Smith (1961) como um responsável pela produção de calor. Análises morfológicas realizadas em cadáveres humanos, não detectaram muito TAM em adultos (HEATON, 1972), sendo assim considerado como um tecido irrelevante em humanos adultos (CYPESS et al., 2009). O interesse científico por este tecido aumento a partir do ano de 2009 quando estudos comprovaram que o TAM está presente nos adultos e é funcional (CYPESS et al., 2009; LICHTENBELT et al., 2009; VIRTANEN et al., 2009).

Análises morfológicas, bioquímicas e moleculares em biópsias de TAM supraclavicular foram capazes de reforçar a discrepância entre o TAM e o tecido adiposo branco (TAB) e destacar as semelhanças entre o TAM de humanos e ratos, demonstrando que estes possuem as mesmas características histológicas e funcionais, como por exemplo, serem capaz de expressar genes específicos da termogênese, como a proteína desacopladora do tipo 1 (UCP-1) (VIRTANEN et al., 2009).

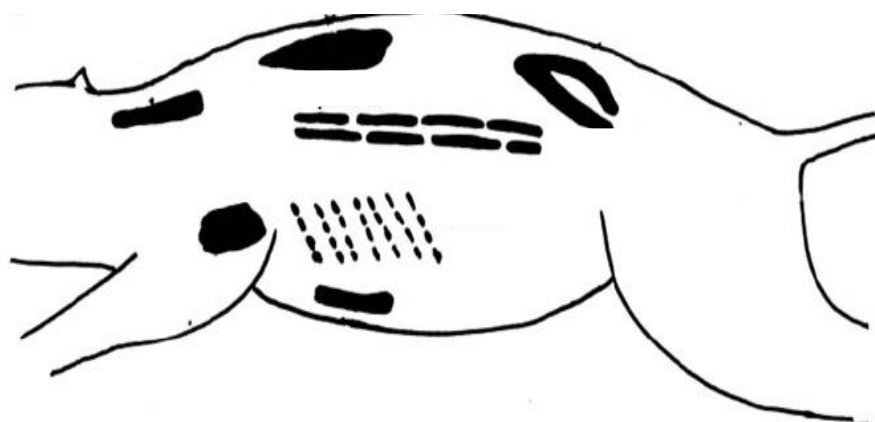
A UCP-1 é uma proteína específica do TAM e é responsável pela propriedade termogênica deste pois, é essencial para a produção de calor, processo conhecido como

termogênese facultativa independente de tremor. Esse processo é considerado um mecanismo regulatório muito importante para a manutenção da temperatura corporal interna dentro de uma faixa muito estreita de variação (HIMMS-HAGEN, 1989b).

A termogênese facultativa independente de tremor acompanha processos metabólicos iniciados pelo sistema nervoso central, e representa toda a produção de calor facultativa que não envolve contração muscular, sendo estimulada pela ativação de receptores cutâneos e hipotalâmicos por meio do sistema nervoso simpático (BANET et al., 1978).

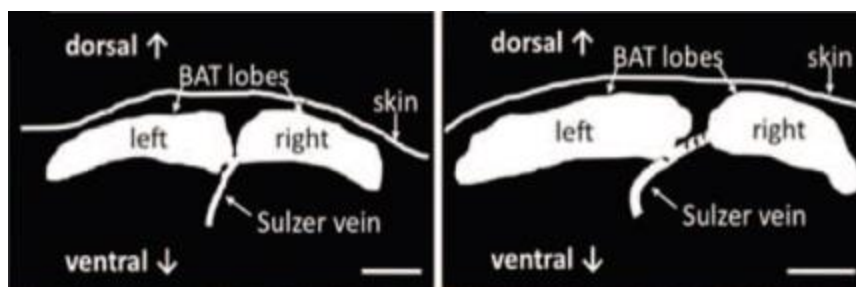
Os depósitos deste tecido em humanos foram encontrados na região anterior do pescoço até o tórax, sendo mais encontrado em mulheres e sua presença foi inversamente proporcional ao índice de massa corporal, à idade, temperatura ambiente registrada fora da sala no momento do exame e ao uso de betabloqueadores adrenérgicos (CYPESS et al., 2009).

O TAM é um tecido muito vascularizado, o que permite a rápida oferta de oxigênio e calor aos outros órgãos, e é encontrado em diversas áreas do corpo do animal em forma de aglomerados envoltos pelo tecido adiposo branco. Encontra-se localizado nos núcleos interescapular, intercostal, periaórtico, perirrenal, e pode ser encontrado também nas regiões axilares, cervicais e ventrais como ilustrado na figura 1. O depósito interscapular é o maior depósito, composto de 40% de adipócitos marrons maduros (NECHAD apud HIMMS-HAGEN, 1989a; BUKOWIECKI et al., 1982,1986).



**Figura 1:** Desenho esquemático da distribuição do tecido adiposo marrom no corpo do rato. Adaptado de Cousing et al., 1992.

O TAM interscapular é composto por dois lobos simétricos com cinco nervos intercostais e um nervo que percorre ao longo dos vasos sanguíneos (HIMMS-HAGEN, 1989a). (Figura 2)



**Figura 2:** Desenhos esquemáticos e representativos do tecido adiposo marrom interscapular de ratos Wild-type. Adaptado de Baron et al., 2012.

A regulação do TAM pode ser realizada por diferentes vias neurais originadas de diferentes áreas centrais de acordo com o estímulo inicial (SONG et al., 2008). A atividade no metabolismo animal é alterada por condições ambientais, estando atrofiado quando não é necessário e ativado em situações de afronta por uma elevada demanda por produção de calor (CANNON e NEDERGAARD, 2004).

Estudos demonstraram que a sincronização e regulação da temperatura de tecidos periféricos, como por exemplo o TAM pode ser feita por vias indiretas, por canais TRP agem como mediadores na regulação da temperatura (Mezzalana, 2015).

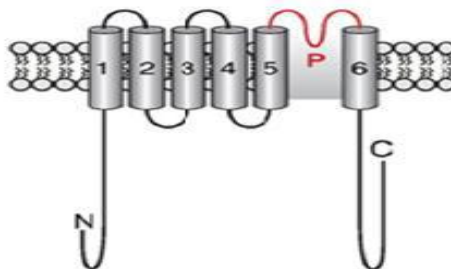
### 1.3 Receptor de Potencial Transitório (TRP)

Em 1969 foi identificado pela primeira vez a família TRP por Cosens e Manning em um mutante espontâneo de *Drosophila melanogaster*. Esses mutantes apresentavam cegueira temporária quando submetidos a uma intensa iluminação, apresentando assim respostas transitórias à estimulação luminosa intensa e prolongada no eletroretinograma (COSENS e MANNING, 1969). Estes resultados eram diferentes do

fenótipo normal que apresentava uma resposta contínua dos fotorreceptores necessários para transdução visual nas moscas. Com base nestes resultados surgiu a denominação receptor de potencial transitório (TRP) (MINKE et al., 1977).

O gene contendo TRP foi isolado pela primeira vez através de uma porção de DNA em 1985, este foi estudado detalhadamente, e então descrito contendo 1275 aminoácidos e seis segmentos transmembrana (MONTPELL e RUBIN, 1989; WONG et al., 1989). Através da estrutura descrita e com base nos estudos eletrofisiológicos com patch clamp de Hardie e Minke (1992) e da análise de sequências de proteínas de Phillips (1992) obteve-se dados suficientes para identificar estas proteínas como canais de cátions não seletivos permeáveis ao cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), e podendo ter sua ativação por diversos estímulos com diferentes graus de seletividade (MINKE e COOK, 2002).

A constituição da estrutura dos monômeros de TRP se dá por seis domínios transmembrânicos com apenas um domínio formado de poro entre o quinto (S5) e o sexto (S6) segmentos, possuindo também regiões terminais denominadas C e N- terminais voltados para região intracelular (MINKE e COOK, 2002; CLAPHAM, 2003). (Figura 3)



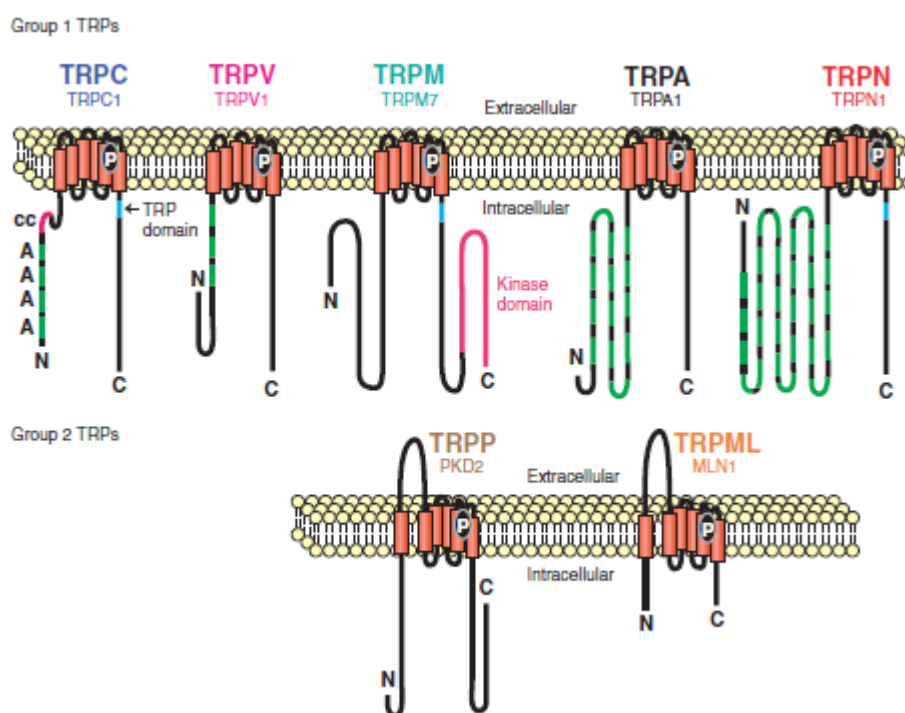
**Figura 3:** Representação esquemática do canal TRP.  
(Fonte: Firth et al., 2007)

A família TRP é um grupo com uma grande diversidade de canais com a função de regular a entrada de cátions, e podem ser diferenciados dos demais grupos pela seletividade de íons, sua forma de ativação e a grande variedade de funções fisiológicas (White et al., 2010; CLAPHAM, 2003; SCHAEFER, 2005). A família TRP é dividida em sete subfamílias. Essa divisão está baseada na sequência de aminoácidos, e os nomes foram baseados na designação dos primeiros membros reconhecidos de cada subfamília: TRPC



(Canônico), TRPV (Vanilóide), TRPM (Melastatina), TRPP (Polistina), TRPML (Mucolipina) e TRPA (Anquirina) (MONTELL et al., 2002; CLAPHAM, 2003; SCHAEFER, 2005; LEVINE e ALESSANDRI-HABER, 2006).

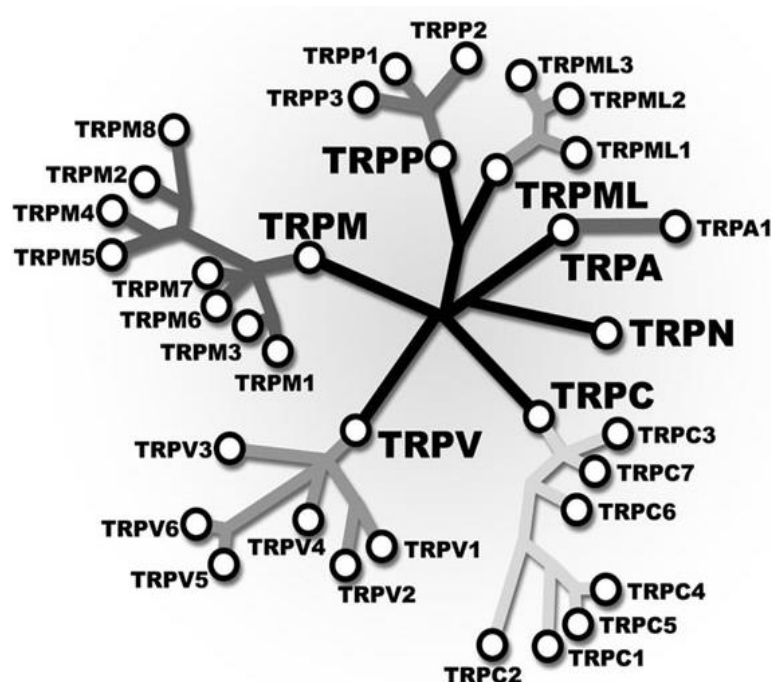
As subfamílias dos canais TRP são divididas em dois grupos, as subfamílias TRPC, TRPV, TRPM, TRPN E TRPA pertencem ao Grupo 1, pois compartilham uma identidade de sequência substancial nos domínios transmembranares. As duas subfamílias restantes, TRPP e TRPML pertencem ao Grupo 2 devido à baixa semelhança na identidade de sequência substancial nos domínios transmembranares quando comparadas aos canais do Grupo 1 e também pelo espaçamento entre o primeiro e o segundo domínio como demonstrado na figura 4 (MONTELL et al., 2005; CLAPHAM, 2003; SCHAEFER, 2005; LEVINE e ALESSANDRI-HABER, 2006).



**Figura 4:** Subfamílias TRPs.

Os cinco representantes das cinco subfamílias do grupo 1 e as duas do grupo 2. Domínios indicados na figura: (A) anquirina, (CC) bobina enrolada, Proteína quina (apenas em TRPM), segmentos transmembranares e o domínio TRP. (Fonte: MONTELL et al., 2005)

Após vários anos da descoberta do primeiro canal de TRP, podemos encontrar citados na literatura mais de 85 canais dentro dessa grande família incluindo animais vertebrados e invertebrados, porém somente 30 são os principais canais estudados como demonstrado na figura abaixo (MONTELL, 2005b). (Figura 5)



**Figura 5:** Filogenia da superfamília dos canais de TRP.  
Fonte: Latorre et al., 2009.

A expressão desses canais ocorre em praticamente todos os tipos de células sendo essas células excitáveis ou não, estando presentes também em todas as membranas celulares, não sendo encontrados apenas nas mitocôndrias nucleares. Esses canais presentes nas membranas de plasma são de grande importância para o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e também para rastrear os íons metálicos que auxiliam este influxo. Os canais TRP estão presentes em muitos órgãos e também nos neurônios sensoriais aferentes primários (MINKE e COOK, 2002; NILIUS e OWSIANIK, 2011).

Caterina et al. (1997) sugeriram pela primeira vez o papel dos canais TRP na mediação da dor e termorregulação. Este estudo teve como foco a subfamília TRPV1, onde

se concluiu que este canal em mamíferos é ativado pelo calor e pela capsaicina, princípio ativo da pimenta, sugerindo que a resposta ao aumento de temperatura é um evento que ocorre devido a uma sinalização específica e não apenas uma consequência das perturbações membranares ou por uma ruptura da integridade da célula (CATERINA et al., 1997).

A partir da descoberta da função da subfamília TRPV1, novos estudos apontam alguns novos representantes das subfamílias dos canais TRP que são sensíveis à variação de temperatura como os TRPV2 (CATERINA et al., 1999), TRPV3 (PEIER et al., 2002a; XU et al., 2002), TRPV4 (GULLER et al., 2002; WATANABE et al., 2002), TRPM8 (MCKEMY et al., 2002) e TRPA1 (PEIER et al., 2002b).

Dos canais supracitados dois são ativados pelo frio (TRPM8 e TRPA1) e sete ativados pelo calor (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM4 e TRPM5). Estes canais agindo em conjunto são responsáveis por perceber as variações de temperatura tanto frio quanto calor nocivos (WANG e SIEMENS, 2015).

#### **1.4 Receptor de Potencial Transitório Vanilóide -1 (TRPV1)**

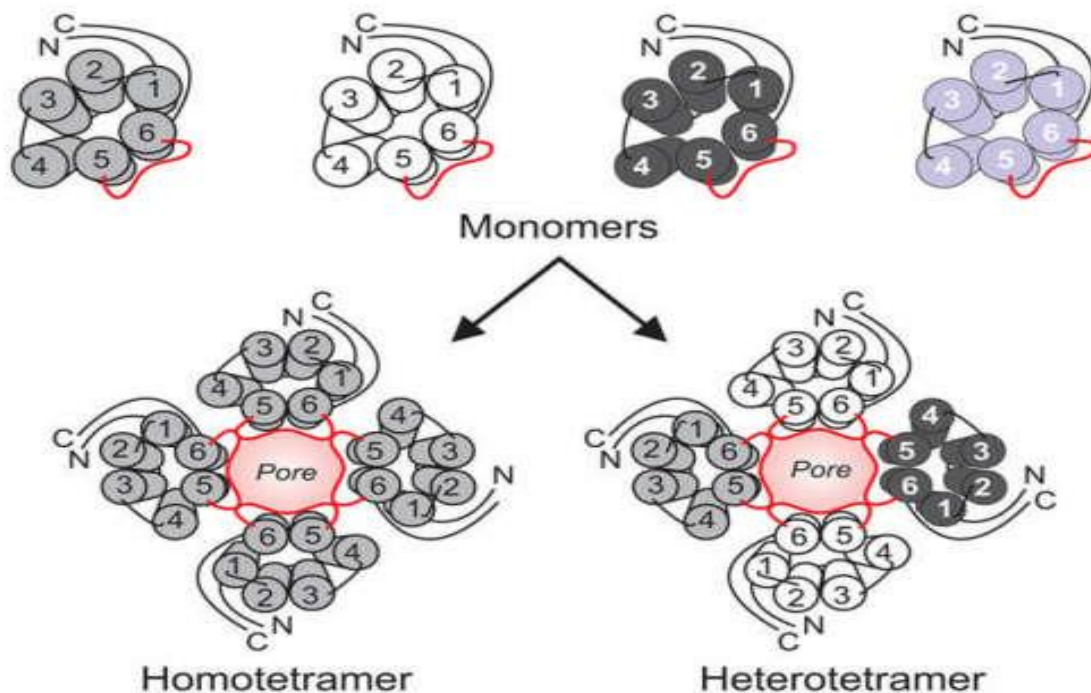
O presente estudo focará no canal TRPV1 que é um importante receptor de canal iônico pertencente à família dos TRP, e foi clonado em 1997 por Caterina e ficou conhecido como receptor vanilóide tipo 1 (VR1) ou também chamado de receptor de capsaicina (SZOLCSANYI, 2004). Recebeu este nome devido à grande sensibilidade do canal à substâncias vanilóides que apresentam grupamentos vanilil, como por exemplo a capsaicina (8-metil-*N*-vanilil-6-nonenamida); presente nas pimentas chili, (LATORRE et al., 2007; NILIUS e OWSIANIK, 2011) e resiniferatoxina (RTX); substância encontrada no látex do cacto *euphorbia resinífera* (SZALASSI e BLUMBERG, 1999). Anos após sua descoberta, foi renomeado pela União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR), ficando conhecido hoje como receptor vanilóide de potencial transitório subtipo 1, TRPV1 (CLAPHAM et al., 2005).

Após a descoberta do TRPV1 outros canais da subfamília vanilóide foram identificados e foram divididos em dois subgrupos, o primeiro subgrupo possui os canais

TRPV 1/2/3/4, já o segundo subgrupo possui os canais TRPV 5/6. Os canais do primeiro subgrupo são moderadamente seletivos ao  $\text{Ca}^{2+}$  e termosensíveis (CATERINA, 2007), os do segundo subgrupo são altamente seletivos ao  $\text{Ca}^{2+}$  e insensíveis às mudanças de temperaturas (CLAPHAM, 2003; NIJENHUIS et al., 2005).

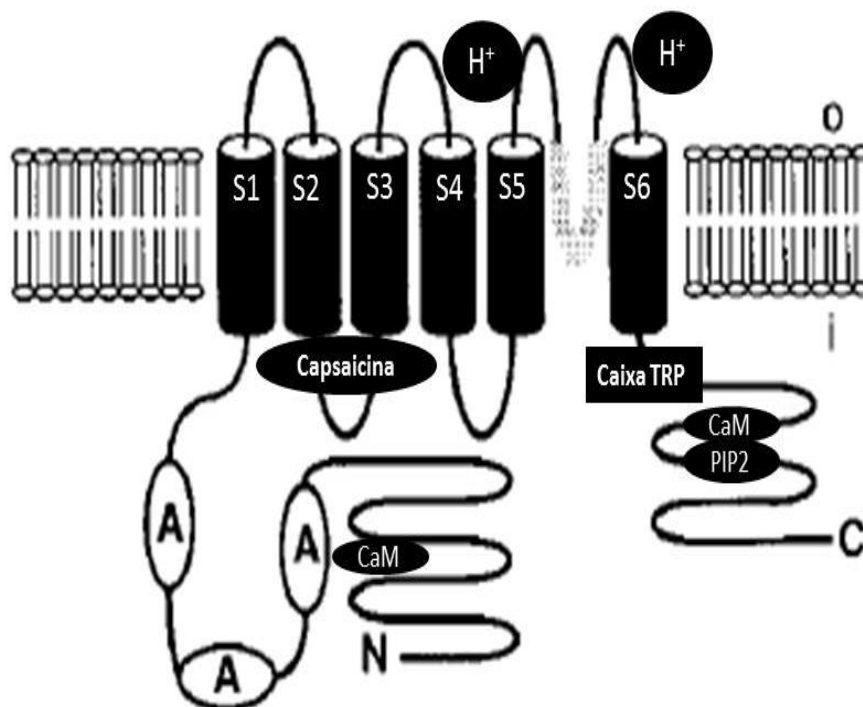
Muitos estudos têm se centrado nos canais de TRPV1 quando comparados com outros canais vanilóides, devido a existência de um agonista seletivo (capsaicina) que tem facilitado e servido como ferramenta para estes estudos, ao passo que para os outros receptores vanilóides ainda falta um agonista e antagonista seletivo (Starowicz et al., 2008; Knotkova et al., 2008). Estudos têm demonstrado a eficiência que os antagonistas dos receptores TRPV1 apresentam na diminuição da nocicepção em modelos animais relacionados a diversos tipos de estímulos dolorosos como a inflamação, a osteoartrite, e a neuropatia (GAVA et al., 2005; RAMMI et al., 2006).

A estrutura dos canais de TRPV pôde ser definida com os estudos de co-imunoprecipitação e ressonância de transferência de energia fluorescente de Hellwig (2005). Nestes estudos, pode-se observar uma maior quantidade de homomultímeros nos TRPV1 e TRPV4, enquanto os TRPV5 e TRPV6 formam preferencialmente heteromultímeros. Os monômeros de TRPV se agrupam formando combinações homo e heterotetrâmicos que formam os tetrâmeros e ancoram-se juntamente com o poro condutor de íons, como representado na figura 6. TRPV1 e TRPV2 possuem poucos receptores heterotetrâmicos, o que pode modificar a sensibilidade do multímero formado (JORDT E JULIUS, 2002; KEDEI et al., 2001; HELLWIG et al., 2005; LIAPI e WOOD, 2005; CATERINA et al., 1999).



**Figura 6:** Representação da estrutura de um monômero destacando seus seis segmentos transmembranares na formação de um canal TRP e também as possíveis formações de tetrâmeros (Homo- ou Hetero-).  
 Fonte: FIRTH et al., 2007.

Kedei (2001) através de vários métodos conseguiu demonstrar que o canal TRPV1 é um multímero constituído por quatro subunidades idênticas. Estas subunidades são denominadas tetraméricas e servem como um determinante molecular para formar um canal funcional de TRPV1 (GARCIA-SANZ et al., 2004). O poro de abertura do canal está situado entre os domínios cinco e seis na estrutura do TRPV1 como ilustrado na figura 7.



**Figura 7:** Estrutura do receptor TRPV1.

Presença de 6 domínios transmembranas, sendo o poro do canal localizado entre o S5 e o S6, possui domínios carboxila- e amino-terminais em cada extremidade. Os sítios de ligação estão representados como: H<sup>+</sup> (capsaicina e ativação por prótons H<sup>+</sup>), A na região N-terminal (anquirina), CaM na região C-terminal (calmodulina) e PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato). (Fonte: CATERINA et al., 1997).

Estudos de Devane (1992) caracterizaram o TRPV1 como um receptor ionotrópico excitatório, pouco seletivo a Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, porém apresentando uma permeabilidade nove vezes maior para Ca<sup>2+</sup> quando comparado ao Na<sup>+</sup> (TOMINAGA et al., 1998; HOLZER, 2008).

O TRPV1 encontra-se amplamente distribuído em áreas como hipocampo, córtex, cerebelo, bulbo olfatório, mesencéfalo e rombencéfalo, presente em neurônios, fibras aferentes e endotélio. Essa ampla distribuição em várias regiões do SNC sugere que os receptores TRPV1 estejam envolvidos em diversas funções do SNC (TOTH et al., 2005). Além disso, foi observado presença destes canais em neurônios perivasculares de artéria mesentérica, que quando ativados levam a liberação de calcitonina induzindo o relaxamento vascular (ZYGMUNT et al., 1999). Estudos sugerem que estes receptores também controlam os estados emocionais relacionados ao medo e a ansiedade, devido a sua presença nas regiões envolvidas na elaboração dos comportamentos defensivos como córtex pré-frontal, complexo amigdalóide, hipocampo e hipotálamo (MEZEY et al., 2000;

MCGARAUGHTY et al., 2003; TOTH et al., 2005). Os canais TRPV1 estão presentes também em tecidos não neuronais como os músculos esqueléticos, trato urinário e estômago (LUO et al., 2011; ROMANOVSKY et al., 2009).

Os canais de TRPV1 podem ser ativados por diversos mecanismos. Um desses mecanismos é a ativação por meio de agonistas endovalinoídes, como por exemplo a anandamida (ZYGMUNT et al., 1999), a N-araquidonoildopamina (NADA) (HARRISON et al., 2003), e produtos derivados da lipoxigenase como o ácido hidroxiperoxi-eicosatetraenóico (12-HPETE) (HWANG et al., 2000). Outro mecanismo de ativação seria através de moléculas exógenas como a capsaina e resiniferatoxina (TOMINAGA e TOMINAGA, 2005). O TRPV1 pode ser ativado endogenamente também pelo calor nocivo ( $> 43^{\circ}\text{C}$ ) e por acidose ( $\text{pH} < 6,5$ ) (STAROWICZ et al., 2007).

Mamíferos quando estão em condições fisiológicas normais, o TRPV1 dificilmente é ativado por pH baixo ou por calor nocivo, sugerindo que estes ligam-se preferencialmente aos ligantes endógenos. Ainda não se sabe ao certo como é feito o controle da produção dos ligantes endógenos do TRPV1, mas sabe-se que a anandamida só é sintetizada quando ocorre estimulação neuronal (DI MARZO e DEUTSCH, 1998).

A capsaicina é um agonista muito seletivo para os canais TRPV1, ela despolariza os neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) causando um aumento na permeabilidade aos íons  $\text{Na}^{+}$  e/ou  $\text{Ca}^{2+}$  (FEIN, 2011), levando a um aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro da célula (SZALLASI e BLUMBERG, 1999; NOLANO et al., 1999). A capsaicina pode agir de duas maneiras distintas, ela pode agir como agonista, induzindo assim a nocicepção (SOUTHALL et al., 2003) ou como resposta oposta devido à dessensibilização dos receptores (SZALLASI e BLUMBERG, 1999; SZALLASI e DI MARZO, 2000; DRAY, 1992; GREEN, 1989; HAYES et al., 1984). Estudos de OBÁL (1983) mostraram que animais dessensibilizados para os canais TRPV1, têm uma diminuição das respostas dos efetores autonômicos durante a exposição de calor, ficando muito comprometida a dissipação de calor na pele da cauda.

A resiniferatoxina (RTX) é análoga da capsaicina e assim como ela, apresenta um grupamento homovanílico que permite sua ligação no receptor de TRPV1 entre os domínios 2 e 3 dentro da célula. As diferenças estruturais entre estes dois compostos é que a capsaicina apresenta uma conformação de amina, enquanto que a RTX apresenta conformação de éster (SZALLASI e BLUMBERG, 1990). Por terem estruturas muito semelhantes, eles apresentam praticamente os mesmos efeitos, sendo que a RTX apresenta

um efeito agonista quase 10 vezes mais potente, o que faz com que esta molécula um ativo útil para estudos da ativação dos receptores TRPV1 (MAGGI et al., 1990).

Tanto a capsaicina quanto o RTX provocam inicialmente a ativação dos canais de TRPV1 e subsequente a dessensibilização. A dessensibilização aguda causada pela capsaicina ocorre nos primeiros 20 segundos de exposição, levando à perda da capacidade de resposta dos nociceptores. Esta dessensibilização do tipo aguda pode estar relacionada com a participação de três mecanismos que podem agir simultaneamente: a desfosforilação do canal pela calcineurina (MANDADI et al., 2004; MOHAPATRA e NAU, 2005), a interação com calmodulina (CaM) (NUMAZAKI et al., 2003; LISHKO et al., 2007) e a depleção de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) na membrana plasmática (LIU et al., 2005; LUKACS et al., 2007; YAO e QIN, 2009).

Devido aos inconvenientes causados pela capsaicina e por esta ser muito irritante, no presente trabalho foi utilizado a RTX, pois além de não ser tão irritante quanto a capsaina, ser mais potente e mais específica como dito anteriormente, ela ainda provoca uma dessensibilização em longo prazo (JANCSO e LAWSON, 1990).

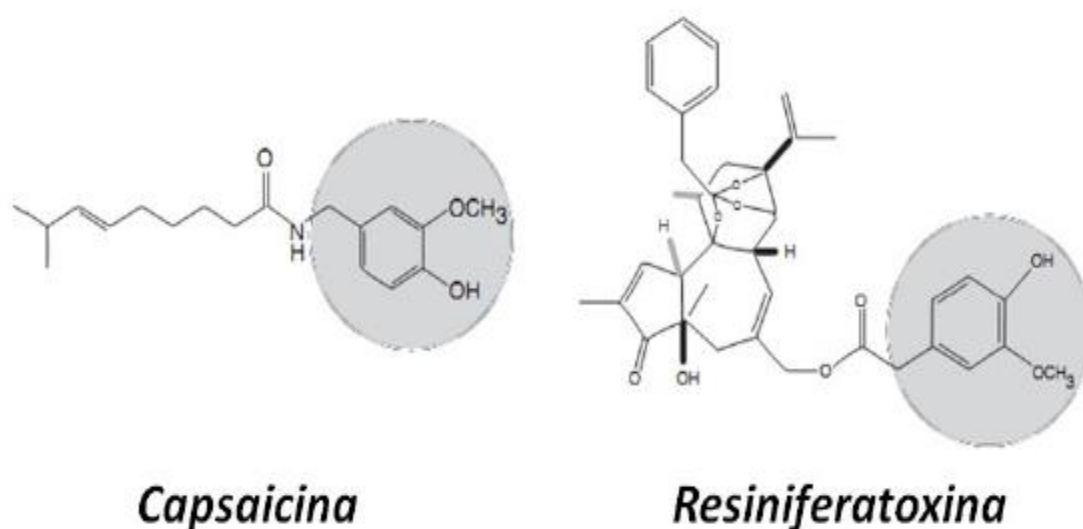
## **1.5 Resiniferatoxina**

A RTX é um diterpeno, e é considerada o composto mais irritante isolado do látex da planta *Euphorbia resinífera*, um cacto do Marrocos (HERGENHAHN et al., 1975). Apresenta estrutura molecular  $C_{37}H_{40}O_9$ , peso molecular de 628,718g/mol (HERGENHAHN et al., 1975) e uma conformação de éster com um grupamento homovanílico permitindo sua ligação específica no receptor TRPV1 entre os domínios 3 e 4 intracelularmente (SZALLASI e BLUMBERG, 1990).

Inicialmente foi caracterizada esperando que esta tivesse atividade promotora de tumor, porém estudos demonstraram que apresenta uma relação entre estrutura e atividade semelhante à capsaicina como ilustrado na figura 8 (SZALLASI e BLUMBERG, 1990). Estudos preliminares confirmaram a homologia possível de RTX e a capsaicina, ambos os compostos produziram uma queda dramática na temperatura corporal dos ratos (SZALLASI e BLUMBERG, 1989). A RTX é considerada o mais potente agonista exógeno e sintético conhecido para o receptor de TRPV1. Este composto é capaz de



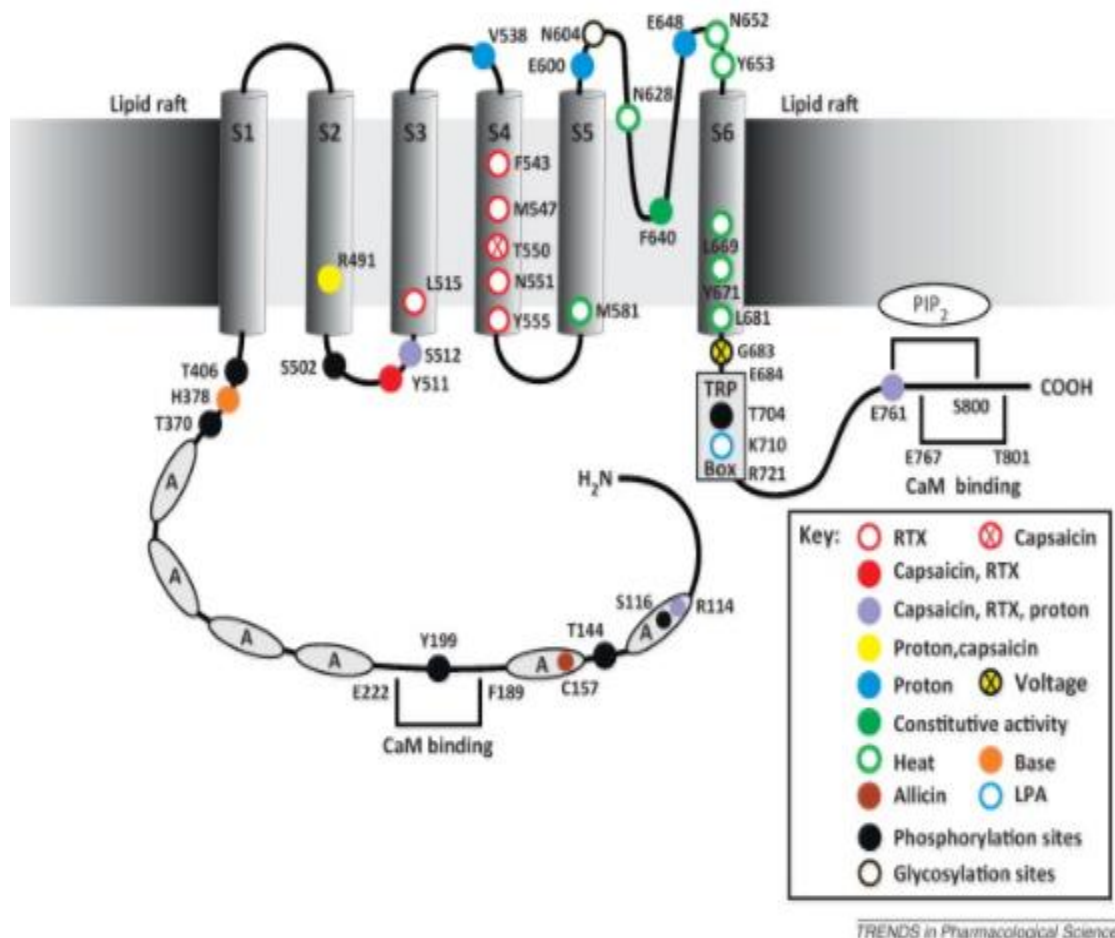
provocar um tempo prolongado na abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando a concentração desse íon na célula, provocando uma citotoxicidade para o corpo celular levando à dessensibilização (KARAI et al., 2004).



**Figura 8:** Estrutura química da capsaicina e resiniferatoxina destacando o grupamento homovanilínico que confere atividade biológica análoga entre as substâncias. Adaptado de Schumacher, 2010.

É uma neurotoxina que tem a capacidade de bloquear o afluxo sensitivo conduzido pelas fibras aferentes vesicais do tipo C que expressam o receptor TRPV1 (SILVA et al, 2002). Quando feita administração intratecal, pode ser capaz de eliminar a expressão neuronal de TRPV1 para atenuar a dor térmica e inflamatória (BROWN et al., 2005; KARAI et al., 2004). Estudos demonstraram que quando administrada periféricamente em uma única dose, a RTX é capaz de produzir analgesia de longa duração, porém reversível (BROWN et al., 2005; KARAI et al., 2004; NEUBERT et al., 2003). Já quando a RTX é injetada por via subcutânea, esta produz uma analgesia térmica durante aproximadamente 20 dias, segundo estudo realizado por Neubert (2003).

Tanto a capsaicina quanto a RTX conseguem atravessar a membrana plasmática do receptor para se ligar no lado intracelular denominado ‘bolso vanilóide’ (‘vanilloid – pocket’) que é formado pelos domínios transmembrana (Ser505 – Thr550) de S3 e S4 (PAPAKOSTA et al., 2011) (Figura 9).



**Figura 9:** Modelo esquemático do canal de TRPV1 juntamente com seus resíduos chave e aminoácidos envolvidos na função de gating produzido por diferentes estímulos.

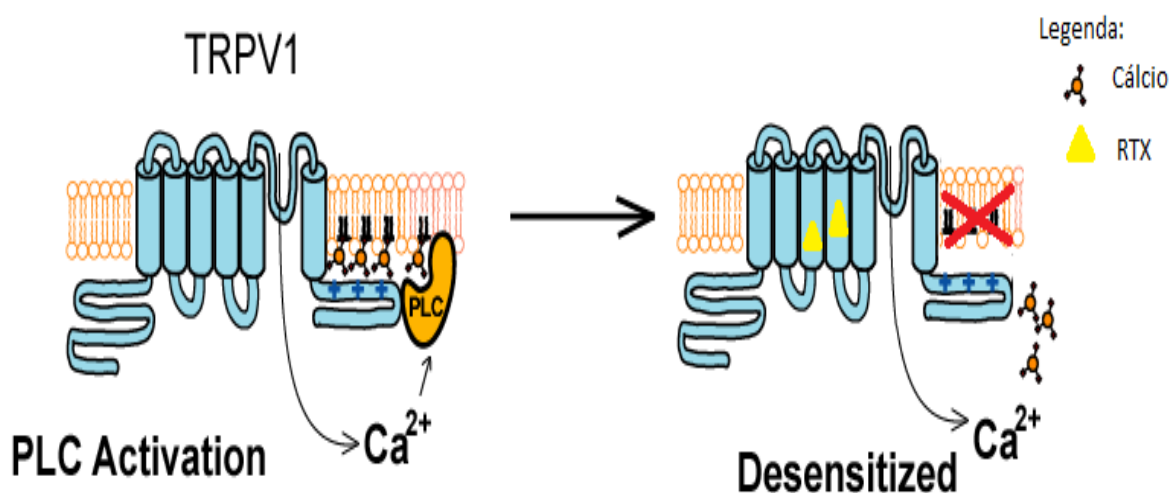
Abreviaturas: TRP, transiente do receptor de domínio potencial conservada para canais TRP é necessária para o  $\text{PIP}_2$  ativação;  $\text{PIP}_2$ , fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; Círculos pretos, locais de fosforilação envolvidos em ações de sensibilização de proteína quinase C (PKC) e proteína quinase A (PKA). Adaptado de LATORRE et al., 2007.

Estudos demonstraram que a funcionalidade do TRP é modulada por diferentes vias de sinalização intracelular, como as que são mediadas pela proteína quinase C (PKC), proteína quinase A (PKA) e fosfolipase C (PLC) (JULIUS, 2013; JULIUS e NATHANS, 2012). Estudos indicam que o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ) um componente importante da membrana plasmática seja o responsável pela regulação dos canais TRP. É necessário para a ativação do TRPV1 que o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro deste canal ative uma forma de  $\text{Ca}^{2+}$  sensível à isoforma PLC. Porém o esgotamento resultante do  $\text{PIP}_2$  leva

à dessensibilização/ inativação destes canais mudando assim a conformação e fechando a abertura por onde entra  $\text{Ca}^{2+}$  (ROHACS, 2013).

A dessensibilização dos canais TRPV1 ocorre por dois mecanismos: a) inativação do canal TRPV1, tornando-o insensível aos diversos fatores endógenos e exógenos que promovem sua abertura; b) inativação ou morte do neurônio que expressa os canais TRPV1 (WINTER et al., 1995). O primeiro processo parece ocorrer mais rapidamente e envolve a desfosforilação do canal TRPV1 mediada por proteínas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  como a calcineurina (NUMAZAKI et al., 2003; MOHAPATRA e NAU, 2005).

A perda na função do neurônio pode ocorrer devido às alterações morfológicas provocadas pela injeção de doses elevadas de capsaicina ou RTX, como o aumento do volume da mitocôndria (SZALLASI e BLUMBERG, 1989; CZAJA et al., 2008) e alterações na membrana celular (Figura 10) e nas organelas citoplasmáticas (JANCSÓ et al., 1995).



**Figura 10:** Modelo esquemático de ativação e dessensibilização causada pelo RTX nos canais TRPV1. Adaptado de Rohacs 2013.

A dessensibilização utilizando a RTX acontece quando esta droga é aplicada em altas doses, este fenômeno pode causar tanto in vivo quanto in vitro, uma longa duração na perda de função acompanhada por mudanças ultra estruturais em um subgrupo de neurônios sensoriais e é capaz de induzir a destruição dos terminais periféricos e terminais centrais nos neurônios nociceptivos (SZOLCSANYI, 1999, 2002, 2008). Estudos

demonstraram que a degradação do PIP2 é um fator determinante para que ocorra a dessensibilização dos canais TRPV1 após exposição prolongada a um estímulo de ativação (LUKACS et al., 2013; LUKACS et al., 2007; LIU et al., 2005).

A dessensibilização causada pela RTX acontece de forma diferente, pois quando a RTX se liga no S3 e S4, os canais se mantêm abertos e o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  continua ativo, mas o  $\text{Ca}^{2+}$  sensível não consegue se ligar a membrana e nem o PLC, não deixando que ocorra a ativação do canal (SZOLCSANYI, 2008, SZALLASI e BLUMBERG, 1999). (Figura 10)

Sabendo que o TRPV é responsável pelo controle da temperatura corporal. E sabendo também que em situações de estresse ocorre o aumento da temperatura corporal. Hipotetizamos que, com os canais de TRPV bloqueados, em situações de estresse, não aconteceria a regulação da temperatura, levando o animal a um quadro de hipertermia.

## **2 – JUSTIFICATIVA**

O aumento observado no número de estados patológicos associados a condições de estresse e ansiedade instiga a busca pela compreensão dos mecanismos que influenciam as reações fisiológicas nestas situações. Para tal é fundamental a identificação dos receptores e vias envolvidas nas respostas a estes estímulos. A termorregulação mediada pelo sistema nervoso central é crítica para a sobrevivência dos mamíferos que estão expostos a uma vasta gama de temperaturas ambientes que poderiam ameaçar a vida. Nos mamíferos, as respostas fisiológicas associadas com o estresse têm como objetivo ampliar a expectativa de vida dos mamíferos.

A compreensão, da função dos canais TRPV's, nas reações fisiológicas observadas durante o estresse, e de como a alteração na atividade desses canais pode influenciar essas reações, amplia as possibilidades de desenvolvimento de novas terapias para reduzir o surgimento e tratar as doenças associadas ao estresse emocional.

### **3 - OBJETIVOS**

#### **3.1 - Objetivo Geral:**

Avaliar a participação do receptor TRPV1 periférico sobre as respostas termorregulatórias e cardíacas em situações de estresse social por rato intruso.

#### **3.2 - Objetivos Específicos:**

- Avaliar o efeito da dessensibilização periférica do receptor TRPV1 por resiniferatoxina (RTX) sobre as respostas termorregulatórias durante e após situações de estresse;
- Avaliar o efeito da dessensibilização periférica do receptor TRPV1 por resiniferatoxina (RTX) sobre as respostas cardíacas durante e após situações de estresse.

## **4 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 - Modelo Animal**

Para a execução deste trabalho utilizamos ratos Wistar pesando entre 330 e 350g, os quais foram cedidos pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto – CCA UFOP. Tais animais foram levados para o Biotério de Experimentação do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, sendo alojados coletivamente em gaiolas com dimensões de 41x34x17cm (três animais por caixa), mantidos a uma temperatura média de  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , em um ciclo claro/escuro de doze horas e recebendo comida (ração comercial Nuvilab®) e água ad libitum. Após a realização do primeiro procedimento cirúrgico (descrito adiante), os animais passaram a ser alojados individualmente em gaiolas com dimensões iguais a 30x19x13cm.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a aprovação prévia do Comitê de Ética da Universidade Federal de Ouro Preto no protocolo número 2016/66. Os experimentos foram sempre realizados de acordo com a Lei Auroca (Lei 11.794) e o Guia de Uso e Cuidados de Animais de Laboratório do National Research Council, EUA

### **4.2 - Delineamento Experimental**

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: Grupo RTX e Grupo Veículo. Os animais do grupo RTX receberam injeção intraperitoneal de RTX (Resiniferatoxina) e foram divididos em: grupo RTX controle (RC) e RTX estresse (RE). Os animais do grupo Veículo receberam injeção intraperitoneal de Veículo e foram divididos em: grupo Veículo Controle (VC) e Veículo estresse (VE).

Todos os grupos passaram pelo procedimento cirúrgico de implante de sensor para registro dos parâmetros fisiológicos de temperatura do tecido adiposo marrom (TAM), temperatura corporal (TCO) e frequência cardíaca (FC). Após 24 horas do final da cirurgia, estes animais foram anestesiados para então receber injeção intraperitoneal de RTX e/ou veículo.

Estes animais tiveram um período de recuperação de 7 dias, e devido ao procedimento cirúrgico muito invasivo, estes animais foram tratados por 3 dias após a cirurgia com antibiótico e anti-inflamatório. Após o final dos 7 dias de recuperação os animais foram submetidos ao protocolo de estresse. Ao termino deste protocolo, após 90 minutos foi realizada a perfusão transcardíaca para retirada do cérebro.



**Figura 11:** Esquema ilustrativo do delineamento amostral.

#### 4.3 - Preparo de drogas/substâncias utilizadas

**PBS (Salina tamponada com fosfato; pH 7,2):** solução preparada pela diluição de 8,18g de NaCl P.A., 1,98 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O P.A. e 0,26 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O P.A. (Synth, LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP) em água ultra-purificada (Milli – Q®) q.s.p. 1000,0 mL. Ajustou-se o pH da solução para 7,2 com soluções de HCl e NaOH, conforme necessidade. A solução foi esterilizada por autoclavação 120°C e 1,0 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos, conforme protocolo em vigor no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular.

**Anestésico (Solução de Ketamina + Xilazina):** Anestésico (Solução de Cetamina + Xilazina): preparado por meio de adição de 3mL de Xilazina (Dopaser - Solução Injetável; Laboratórios Caller AS, Barcelona/Espanha) 3% (p/v) a 10mL de Cetamina (Cloridrato de Cetamina 10%; Syntec do Brasil Ltda, Fabricante: Rhobifarma Industria Farmacêutica Ltda, Hortolândia/São Paulo) 10% (p/v). Utilizada da seguinte forma: dose (Cetamina: 80mg/kg; Xilazina: 7mg/kg) e volume (0,1mL/100g de animal; i.m.).



**Anestésico Inalatório:** Isoflurano 100% (Instituto Biochimico Industria Farmacêutica Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira/São Paulo). Administrado via aérea na dose de 2–2,5% em 2L de oxigênio (O<sub>2</sub>) por minuto.

**Anestésico Local - Cloridrato de Lidocaína 2%:** no momento da utilização, diluímos 0,1mL do Cloridrato de Lidocaína 2% (Rhobifarma Indústria Farmacêutica LTDA, Hortolândia/São Paulo) em 0,2mL de PBS.

**Antiinflamatório [Ketoflex 1% p/v (Cetoprofeno)]:** empregado com o objetivo de reduzir inflamação e dor decorrente dos procedimentos cirúrgicos. Utilizado da seguinte forma: dose (4mg/Kg) e volume (0,1 mL/100g de animal; s.c).

**Antibiótico (Pentabiótico Veterinário):** utilizado na prevenção de infecções, na seguinte dose: 48.000UI de penicilina, 20mg de estreptomicina e 20mg de diidroestreptomicina/kg. Volume injetado: 0,1 mL/100g de animal; s.c..

**Resiniferatoxina (agonista dos receptores TRPV1 e também agente dessensibilizador neuronal):** Diluído em álcool absoluto até atingir a concentração de 100µg/ mL, diluindo-se 1 mg da droga em 10 mL de álcool etílico, separado em alíquotas de 70µL e mantido congelado a -80°C. No dia da injeção, estas alíquotas foram diluídas cinco vezes com salina estéril a fim de obter a concentração de 20µg/ Kg, cujo veículo correspondia a 20% de etanol dissolvido em salina estéril. Cada animal recebeu a injeção de 1 mL/kg da solução. Volume injetado: 20µg/ mL intraperitoneal sob anestesia. Na dose supracitada, a RTX dessensibiliza os canais TRPV1 presentes na cavidade animal, por pelo menos 19 dias, sem dessensibilizar os canais presentes em outros compartimentos corporais, incluindo o cérebro, conforme demonstrado por diferentes ensaios (STEINER et al., 2007; DOGAN et al., 2004).

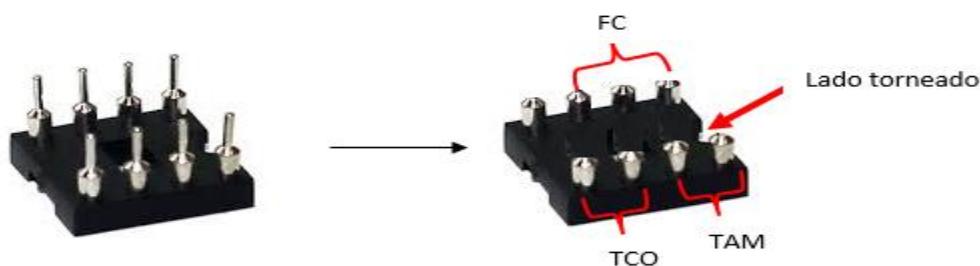
**Solução paraformaldeído 0,1M a 4%:** solução preparada a partir do aquecimento, sob agitação, de 40g de paraformaldeído em pó (Vetec Química Fina – SIGMA-ALDRICH, Brasil), duas ou três gotas de NaOH 1M, 500 mL de PB 0,1M e água destilada até que fosse atingido o volume final de 1000mL. Verificou-se se o pH (Sensoglass, Sensores Analíticos – Modelo SC02) da solução estava entre 7,0 e 8,0.

#### 4.4 - Confeção de materiais utilizados

Foi utilizado o guia do laboratório do Prof<sup>o</sup> William Blessing (How to make head socket and termistor probes, version 2, July 2009) gentilmente cedido para base de montagem e adaptação dos nossos sensores. Para confecção do sensor de temperatura foi utilizado um fio de aço inoxidável (New England Wire – N12-50F + 00006-0) duplo, trançado manualmente nas medias de 13 cm para o tecido adiposo marrom (TAM) e 8 cm para temperatura corporal (TCO), e termistor NTC 10KOhms (Fabricante Murata – série NCP). A capa de plástico protetora do fio foi retirada com auxílio de uma lâmina de bisturi e cada fio foi fixado respectivamente nas extremidades do resistor. Após o término do processo de soldagem, estes cabos foram testados com ajuda de um voltímetro, para avaliar se estavam corretamente unidos e se existia corrente. Os termistores já soldados, foram então higienizados com algodão umedecido em água e depois álcool 70%, para retirada de qualquer vestígio de resíduo de ácido utilizado no processo de soldagem. Estes foram revestidos com cola silicone em gel (Dow Corning 3145 RTV) de forma que este termistor ficasse bem protegido.

Para confecção do sensor de frequência cardíaca (FC), foi utilizado o mesmo fio de aço inox, porém não trançado. Para cada animal foi necessário a confecção de 3 fios de tamanhos 13 cm para inserção no processo xifoide, 8 cm para inserção na traquéia e 7 cm para inserção no dorso do animal. Foi retirado aproximadamente 1,5 cm da proteção de silicone que envolve o fio e estes foram enrolados formando uma argola na ponta do fio. Para finalizar e garantir que esta argola não desenrolasse, foi utilizado um pedaço de capa de fio preta aquecida para finalizar e prender o fio.

Finalizado os 3 sensores de FC e os 2 de temperatura, estes foram então soldados em uma base denominada soquete torneado de 8 pinos (modelo CPT 008-BA). Nesta base foram cortadas as pontas dos pinos com ajuda de um alicate e então soldado os sensores, sendo os de FC de um lado e de Temperatura de outro como ilustrado na figura abaixo.



**Figura 12:** Imagem ilustrando o modelo do termistor utilizado para confecção dos sensores e suas respectivas ligações para FC, TCO e TAM.

Após a soldagem dos respectivos sensores na base do soquete, foi então passado esmalte nas soldas, protegendo-as para que não soltassem. Foi preparado uma mistura de acrílico em pó e solvente para revestir toda a parte dos pinos, fazendo uma proteção para a base soldada, finalizando com cola silicone em gel para impermeabilizar a saída dos fios e esta base de acrílico, impossibilitando assim a passagem de água para dentro da base.

Todos os sensores após finalização da confecção foram calibrados para confirmação dos valores para temperatura. O valor de calibração de cada sensor foi anotado e guardado para utilização no dia de registro.

## 4.5- Cirurgia

### 4.5.1 - Implante de sensores de Temperatura e FC

O procedimento cirúrgico foi adaptado a partir do modelo de Ootsuka et al. (2009).

Os animais foram anestesiados com anestésico inalatório isoflurano e feita a tricotomia iniciada no meio do dorso em direção a cabeça entre os pavilhões auditivos e os olhos, também foi feita na região torácica próximo à traqueia e na região abdominal próximo ao processo xifoide.

Após a tricotomia de todas as regiões, os animais foram acomodados e fixados a um aparelho estereotáxico (Stoelting Co., Illinois, EUA) e continuaram anestesiados com

anestésico inalatório isoflurano, para a fixação do sensor na região superior do crânio entre os pavilhões auditivos. A região tricotomizada entre os pavilhões auditivos foi submetida à assepsia com PVPI degermante e, após foi realizada injeção subcutânea de cloridrato de lidocaína 2% associado a epinefrina, para provocar uma vasoconstrição local. A região superior do crânio foi exposta a partir de uma incisão mediana, dois orifícios foram realizados para a fixação de parafusos de aço inoxidável no crânio dos animais para auxiliar na fixação do acrílico para sustentação do sensor. Foi feita uma pequena incisão na região próxima à escapula, por onde foi passado no sentido crânio caudal todos os fios do sensor. A base do sensor foi posicionada no centro da incisão realizada no crânio e fixada com solução de acrílico e auxílio da torre do estereotáxico fazendo uma pressão em cima desta base, para que ficasse bem presa. Com a base do sensor fixada, o animal foi retirado do aparelho estereotáxico e colocado novamente na placa de suporte cirúrgico e foi feita uma incisão no meio do dorso expondo a musculatura dorsal, próximo à região do tecido adiposo marrom (TAM) interscapular. Com ajuda de uma pinça e tesoura o TAM foi exposto e realizada a dissecação entre músculo intercostal e tecido adiposo marrom até a veia Sulzer localizada na região interscapular no TAM. O sensor de temperatura de maior comprimento foi alojado o mais próximo possível desta veia Sulzer e fixado para que não deslocasse com a movimentação do animal. Um sensor de FC (terra) também foi fixado no dorso do animal, mais precisamente na região interscapular.

Foi feita uma pequena incisão na região abdominal, mais precisamente na região do processo xifoide, onde este foi exposto para fixação do sensor de FC. Com o auxílio de um pequeno tubo de metal (trocáter) e uma hemostática, o sensor foi passado pelo tecido subcutâneo do animal, da região interescapular até sua exteriorização na região do processo xifoide. O sensor foi fixado na cartilagem do processo xifoide.

Para inserção do sensor de Temperatura e FC na região torácica mais precisamente na traquéia, foi feita uma incisão nesta região deixando a traqueia exposta. Com o auxílio de um pequeno tubo de metal (trocáter) e uma hemostática, os sensores foram passados pelo tecido subcutâneo do animal, da região interescapular até sua exteriorização na região da traqueia. O sensor de temperatura foi alocado descendo dentro da musculatura que protege a traqueia e o de FC fixado no musculo onde foi realizada a incisão para exposição da traqueia.

Ao final de cada implantação de sensor, os locais de incisão foram suturados.

Os animais foram submetidos a um período de recuperação por 8 dias antes do início dos procedimentos experimentais. No momento do registro a base afixada na cabeça

do animal foi conectada ao sistema de aquisição de dados para obtenção dos sinais de Temperaturas e FC.

#### **4.6 - Cuidados pós-operatórios**

Após a cirurgia, os animais receberam injeção *s.c.* de cetoprofeno (Ketoflex®) e uma dose profilática de penicilina (Pentabiótico Veterinário - Fort Dodge, São Paulo, Brasil) para prevenção de infecções e inflamações. Estas injeções também foram administradas por 3 dias após a cirurgia devido ao procedimento cirúrgico ser muito invasivo. Os animais foram alocados em gaiolas individuais e mantidos sobre manta térmica até a passagem completa do efeito do anestésico, a fim de evitar hipotermia. Posteriormente, os animais foram mantidos no biotério sob condições de temperatura, luminosidade e níveis de ruído controlados, com alimentação e água *ad libitum*.

#### **4.7 – Procedimento de Injeção Intraperitoneal (i.p.)**

Os animais foram anestesiados com anestésico inalatório isoflurano 24h após a cirurgia para implante de sensor e receberam uma injeção intraperitoneal de RTX e/ou veículo.

Após a injeção os animais foram retirados do anestésico, alocados em gaiolas individuais e mantidos em observação até passagem completa do efeito do anestésico.

Para que seja possível observar o efeito da droga RTX no animal, foi necessário aguardar 7 dias após o dia da injeção para iniciar os experimentos, sendo estes dias necessários também para recuperação dos animais após a cirurgia.

#### **4.8 - Registro do parâmetro cardiovascular de frequência cardíaca (FC)**

Para obtenção do registro do parâmetro cardiovascular de FC, a base do sensor fixada na cabeça do animal foi conectada a um computador, que ligado a um sistema de aquisição de dados Power Lab 4/20 (ADInstruments) possibilitou o registro da FC. As mili voltagens captadas foram convertidas em batimentos por minutos (BPM) possibilitando a leitura da FC. O software de leitura LabChart 7 for Windows realizou uma coleta contínua dos milivolts, calculando a partir desta, os valores de FC.

#### **4.9 - Registro dos parâmetros fisiológicos de temperatura corporal interna (TCO) e temperatura do tecido adiposo marrom (TAM)**

Para obtenção do registro dos parâmetros fisiológicos de TCO e TAM, a base do sensor fixada na cabeça do animal foi conectada a um computador, que ligado a um sistema de aquisição de dados ETH – 400 Bridge Amplifier (CB Sciences, Inc.) possibilitou o registro destas temperaturas. As mili voltagens captadas foram convertidas em graus Celsius (°C) possibilitando a leitura dos valores correspondentes à temperatura de cada local. O software de leitura LabChart 7 for Windows realizou uma coleta contínua dos milivolts, calculando a partir desta, os valores de temperatura.

Todos os sensores de temperatura após finalizados, passaram pelo processo de calibração antes de ser implantados nos animais. Cada sensor possui um valor diferente referente aos dados coletados dos valores de milivolts para as temperaturas de 33°C e 42°C respectivamente medidos por um termômetro na hora da calibração. Todos estes valores se encontram preenchidos em tabela específica de cada animal.

No dia do experimento, estes valores foram substituídos no programa LabChart na opção Units conversion para os canais específicos para temperatura (canais 2 e 3).

#### **4.10 - Registro de temperatura da cauda e região interescapular dorsal através de fotos Infravermelho**

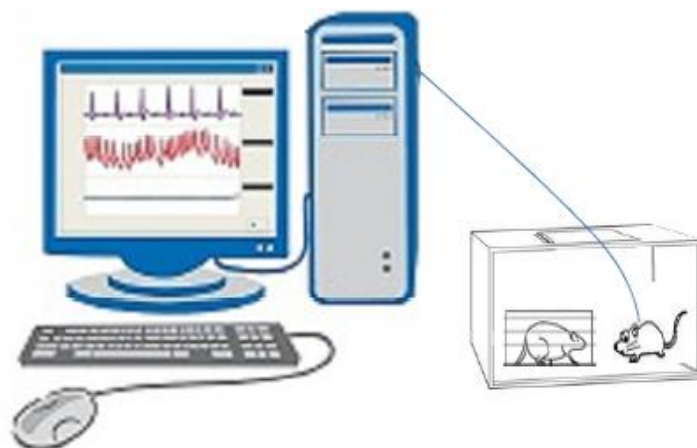
Com o propósito de verificar e registrar os valores da temperatura da cauda e da região interescapular dorsal do animal para posterior análise, as imagens termais foram obtidas antes do estresse por rato intruso (minuto 0) por 5 minutos, durante os 15 minutos de estresse e nos 10 minutos finais de recuperação. As imagens termais fotos foram tiradas com intervalos de 1 minuto e a análise das imagens foram realizadas através do software FLIR.

#### **4.11 – Protocolo estresse por rato intruso.**

O protocolo experimental foi realizado em sala com temperatura controlada ( $26 \pm 1$ ), correspondente à zona de termo neutralidade para ratos (Gordon, 1990).

Após o período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares e de temperatura (basal inicial) os animais foram submetidos ao procedimento de estresse social por meio da sua inserção em uma caixa de outro animal não familiar, tornando-se um “rato intruso” em tal situação, por 15 minutos.

Este protocolo desenvolvido e padronizado pelo Laboratório de Fisiologia Cardiovascular – UFOP (Mesquita et al., 2016) foi adaptado a partir de dois modelos, em um o animal é treinado a se tornar agressivo a outros animais, e o animal intruso é introduzido na gaiola do animal residente permanecendo até que ocorra a primeira reação agressiva, neste momento são separados por uma divisória de aço perfurada onde podem se ver, ouvir e sentir o cheiro um do outro (Kenney et al., 2006), enquanto no outro modelo, o animal analisado é o residente, e um animal intruso é colocado por 30 minutos dentro de uma pequena gaiola para que possam interagir apenas pelas frestas da gaiola (Mohammed e cols., 2014).



(Adaptado de Telemetry Research, 2011)

**Figura 13:** Desenho esquemático do procedimento de estresse social por rato intruso.

Após os 15 minutos, o animal intruso foi retirado de dentro da caixa do outro animal e colocado novamente na sua, permanecendo em basal de final (período de recuperação) por mais 10 minutos.

Os animais do grupo controle que não foram submetidos somente ao procedimento de estresse por rato intruso, permaneceram durante todo o período experimental dentro de suas caixas, mas durante os períodos correspondentes de 5 minutos iniciais, 15 minutos de estresse, e 10 minutos finais foram realizados os registros de temperatura e FC e fotos de cauda e dorso.

#### **4.10 - Procedimentos Histológicos**

Ao término dos Protocolos Experimentais foi necessário aguardar 90 minutos para iniciar a perfusão transcardíaca. Anestesiamos os animais com o dobro da quantidade de solução de Ketamina + Xilazina (descrito no item 3.3), submetendo-os a uma toracotomia para a exposição do coração. Através de punção cardíaca, realizamos a perfusão com solução salina (0,9%), seguida de solução de paraformaldeído tamponado (4%). Posteriormente, retiramos e fixamos o cérebro em solução de formaldeído tamponado 4% por 24 horas. Após este período, os cérebros foram transferidos para uma



solução de sacarose a 30% (diluído em água destilada) permanecendo por 48 horas para posteriores análises histológicas.

#### **4.11 - Análises dos dados**

A análise dos dados para os gráficos de linha para as variáveis tempo e tratamentos (RTX e veículo) foram realizadas utilizando dados a cada 2 minutos, sendo assim no período de basal inicial estão os tempos -4 e -2, o tempo 0 (zero) foi o momento em que os animais foram colocados ou não no período de estresse, período este representado pelos tempos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, seguidos pelo basal final (tempo de recuperação) de os animais permaneceram em registro por 30 minutos, porém foram analisados os 10 primeiros minutos logo após o estresse, tempos 18, 20, 22, 24, 26 e os últimos 10 minutos, tempos 28, 30, 32, 34, 36.

Para análise dos gráficos de delta da maior variação para as variáveis tratamento (RTX e veículo) e condição (Estresse e Controle) foi utilizado o valor mais alto encontrado durante todo o experimento diminuído da média dos valores de basal inicial. Já para a análise dos gráficos de delta dos 4 minutos finais para as variáveis tratamento (RTX e veículo) e condição (Estresse e Controle), foi utilizado a média dos últimos 4 minutos do período de basal final diminuído da média dos valores de basal inicial.

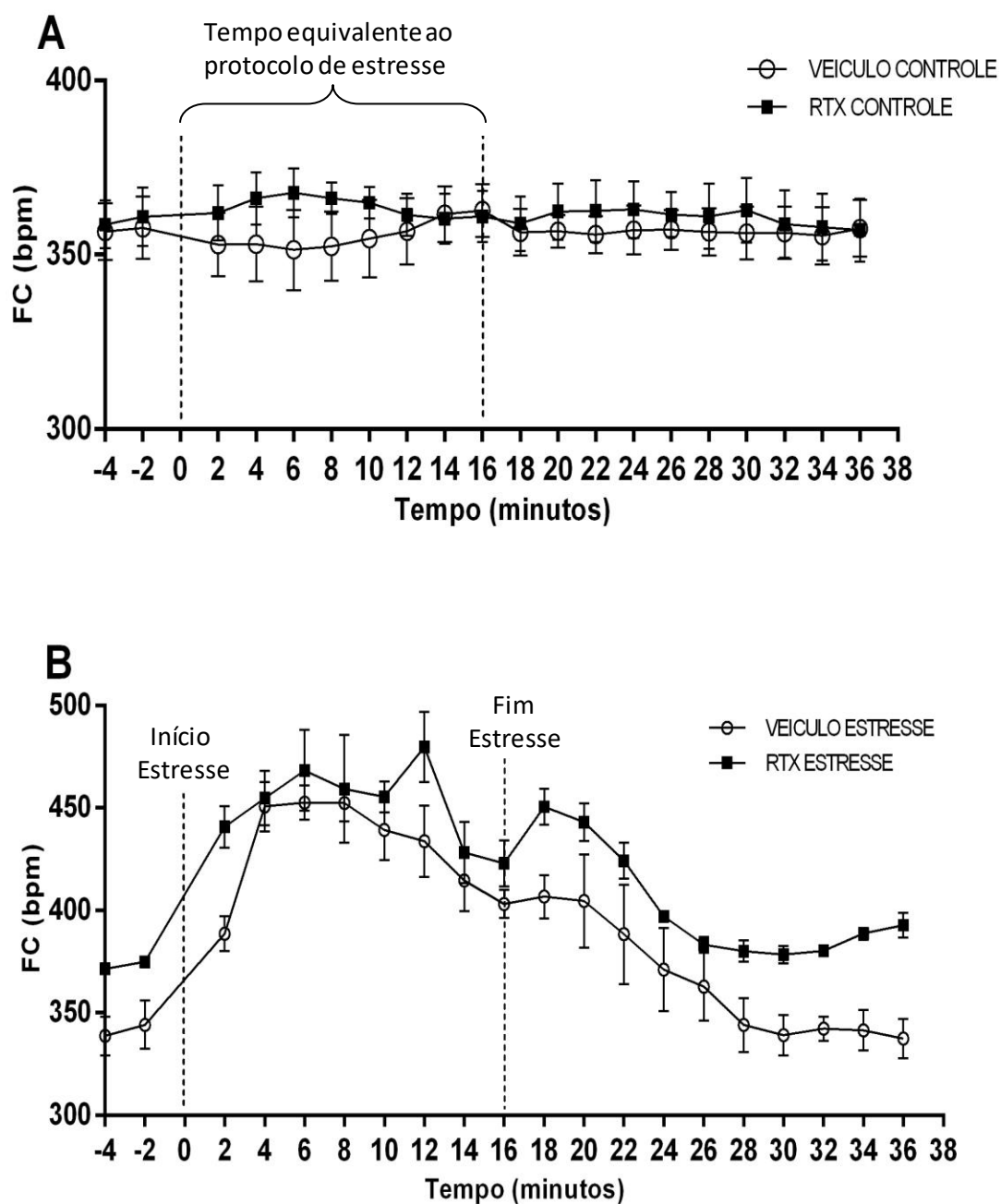
#### **4.12 - Análises Estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 ®. Para análise das alterações cardíacas de FC e temperaturas TAM e TCO utilizamos análise de variância ANOVA two-way, seguido de pós-teste Sidak (média  $\pm$  Desvio Padrão). O nível de significância foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **5 - RESULTADOS**

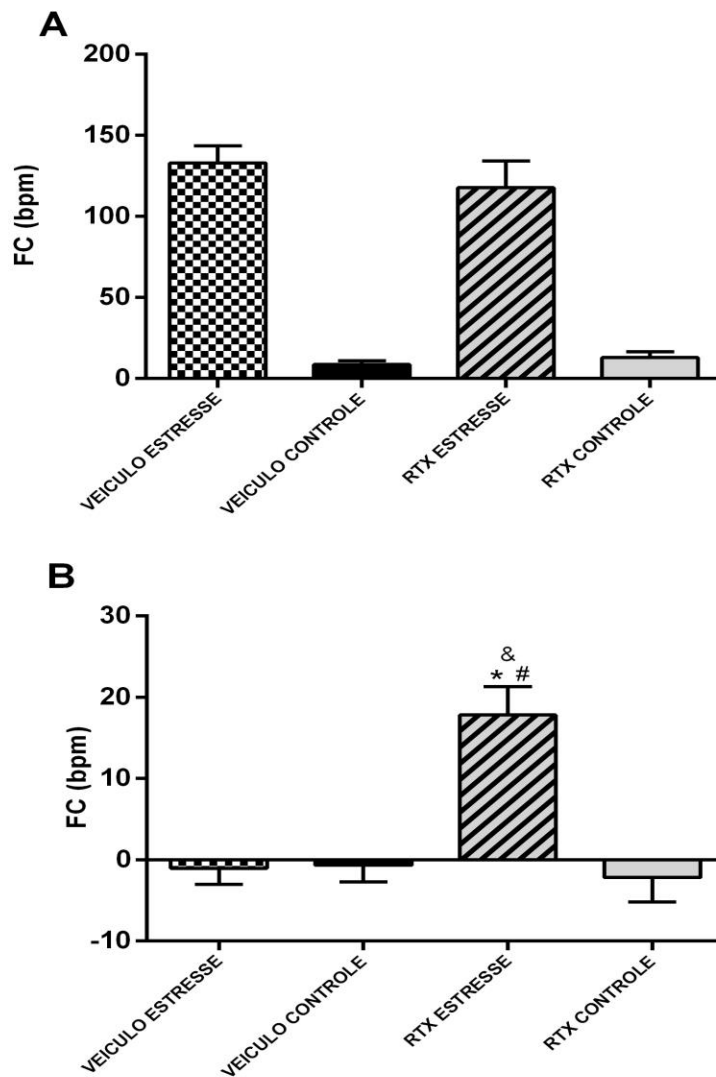
### **5.1 - Efeitos da dessensibilização dos receptores TRPV1 por RTX no controle cardiovascular de animais expostos ao estresse social**

De maneira ilustrativa, a figura 14A representa os diferentes valores de FC dos animais denominados controles, aqueles que não foram submetidos à exposição ao estresse social por rato intruso. O teste Two-way Anova não mostrou diferenças significativas entre os grupos nas variáveis tratamento ( $F(1, 8) = 0,2775$ ;  $p=0.61$ ), tempo ( $F(19, 152) = 0,3066$ ;  $p= 0,99$ ) e interação entre tratamento x tempo ( $F(19, 152) = 1,137$ ;  $p = 0,32$ ) durante o período de experimento. A figura 14B representa os diferentes valores de FC, antes, durante e após a exposição ao estresse social por rato intruso, nos animais tratados com RTX ou veículo. Ambos os grupos apresentaram aumento nos valores de FC durante o período de estresse, porém o teste Two-way Anova mostrou diferenças significativas somente para as variáveis tratamento ( $F(1,8) = 10,52$ ;  $p = 0,01$ ) e tempo ( $F(19, 152) = 26,20$ ;  $p < 0,0001$ ), não sendo significativo na interação entre tratamento x tempo ( $F(19, 152) = 0,96$ ;  $p = 0,50$ ). O pós- teste de Sidak mostrou diferenças significativas no basal final no minuto 36 com  $p < 0,05$ .



**Figura 14:** Níveis de FC (bpm) antes, durante (entre linhas tracejadas) e após o estresse. (A) Representa os diferentes valores de FC entre os animais RTX controle e Veículo Controle. (B) Representa os diferentes valores de FC entre os animais RTX estresse e Veículo Estresse. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. \* Diferença estatística do grupo RTX em relação ao grupo veículo, Anova two way, com pós-teste Sidak ( $p < 0,05$ ).

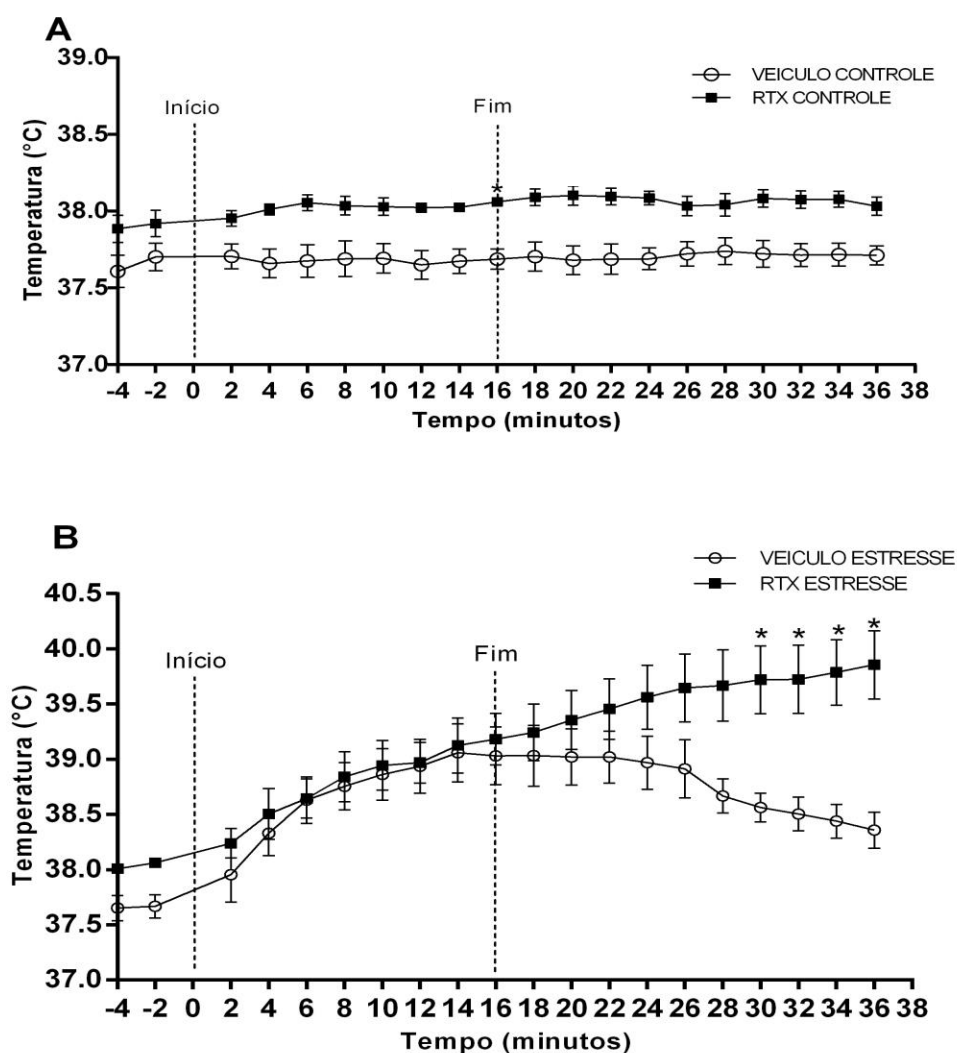
A figura 15A representa os valores de delta de maior variação de FC (maior valor encontrado após início do estresse até o final menos a média dos valores de basal inicial) para todos os grupos. O teste Two-way Anova mostrou diferença significativa entre os grupos condição ( $F(1, 16) = 132,1$ ;  $p < 0,0001$ ). A figura 15B representa os valores de delta dos 4 minutos finais de FC (média dos últimos 4 minutos menos a média dos valores de basal inicial) para todos os grupos. O teste Two-way Anova mostrou diferença significativa entre os grupos de tratamento ( $F(1, 16) = 11,030$ ;  $p = 0,0054$ ), entre os grupos condição ( $F(1, 16) = 13,29$ ;  $p = 0,0022$ ) e a interação entre tratamento e condição ( $F(1, 16) = 14,25$ ;  $p = 0,0017$ ). O pós-teste de Sidak mostrou diferenças significativas entre os grupos VC vs RE, RC vs RE e VE vs RE com  $p < 0,05$ .



**Figura 15:** Alterações na FC (bpm) evocadas pelo estresse social em ratos controle e dessensibilizados por RTX. (A) Delta do valor de maior variação de FC durante o estresse em relação aos 4 minutos pré-estresse. (B) Delta do maior valor de FC pós-estresse em relação aos 4 minutos iniciais pré-estresse. \* Diferença estatística do grupo RTX em relação ao grupo veículo controle. # Diferença estatística do grupo RTX estresse em relação ao RTX controle. & Diferença estatística do grupo RTX estresse em relação ao veículo estresse. Anova two way, com pós-teste Sidak ( $p < 0,05$ ).

## **5.2 - Efeitos da dessensibilização dos receptores TRPV1 por RTX no controle da temperatura TAM de animais expostos ao estresse social**

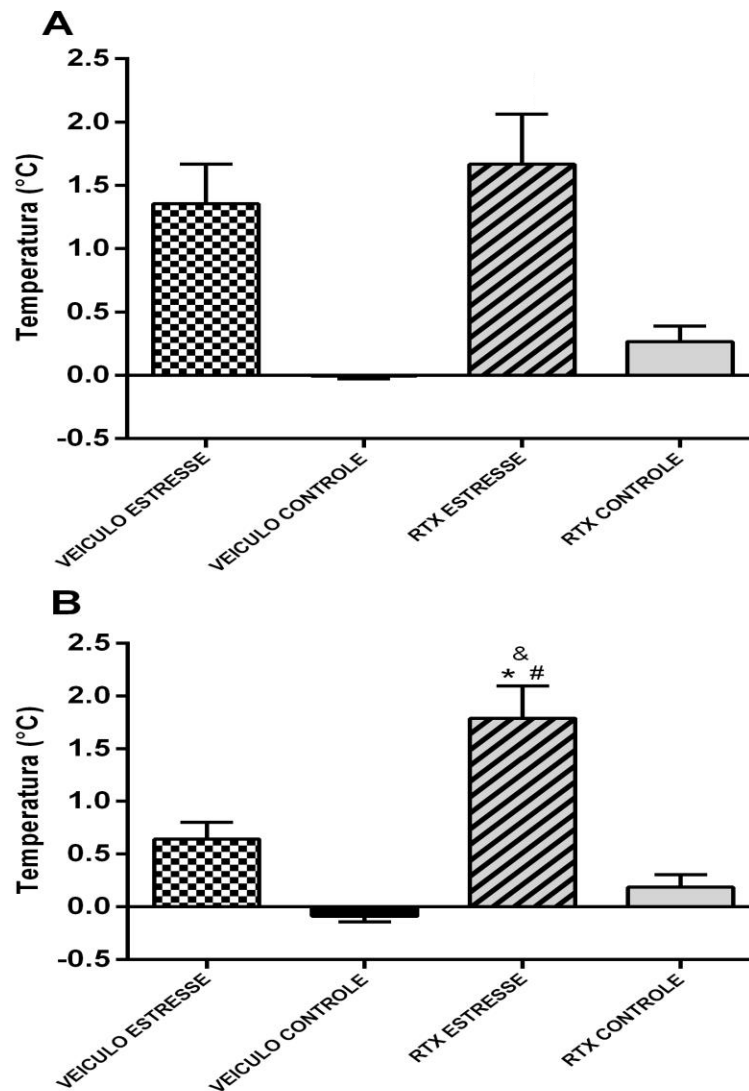
A figura 16A representa os diferentes valores da temperatura do TAM dos animais denominados controles, aqueles que não foram submetidos a exposição ao estresse social por rato intruso. O teste Two-way Anova apresentou diferenças significativas para as variáveis tempo ( $F(19,152) = 1,777$ ;  $p = 0,0301$ ), tratamentos ( $F(1, 8) = 14,82$ ;  $p = 0,0049$ ), porém não apresentou diferença significativa na interação entre tempo e tratamentos ( $F(19, 152) = 0,84$ ;  $p = 0,65$ ). A figura 16B representa os diferentes valores da temperatura do TAM, antes, durante e após a exposição ao estresse social por rato intruso, nos animais tratados com RTX ou veículo. O teste Two-way Anova mostrou diferenças significativas somente para a variável tempo ( $F(19, 152) = 29,99$ ;  $p < 0,0001$ ), não sendo significativa para tratamento ( $F(1,8) = 3,259$ ;  $p = 0,1087$ ), porém apresentou diferença significativa na interação tratamento x tempo ( $F(19, 152) = 8,144$ ;  $p < 0,0001$ ). O pós-teste de Sidak mostrou diferença significativa somente após o período de estresse, nos tempos 30, 32, 34 e 36  $p < 0,05$ .



**Figura 16:** Alterações nos valores de temperatura do TAM (°C) antes, durante (linha tracejada) e após o estresse social. (A) Representa os diferentes valores de temperatura do TAM entre os animais RTX controle e Veículo controle. (B) Representa os diferentes valores de temperatura do TAM entre os animais RTX estresse e Veículo estresse. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. \* Diferença estatística do grupo RTX em relação ao Veículo. Anova two way, com pós-teste Sidak ( $p < 0,05$ ).

A figura 17A representa os valores de delta de maior variação da TAM (maior valor encontrado após início do estresse até o final menos a média dos valores de basal inicial) para todos os grupos. O teste Two-way Anova mostrou diferença significativa somente para as variáveis condição ( $F(1, 16) = 28,46$ ;  $p < 0,0001$ ), não sendo significativo para a variável tratamento ( $F(1, 16) = 1,271$ ;  $p = 0,2763$ ) e para a interação condição x tratamento ( $F(1, 16) = 0,0059$ ;  $p = 0,9394$ ). A figura 17B representa os valores de delta dos 4 minutos finais da TAM (média dos últimos 4 minutos menos a média dos valores de

basal inicial) para todos os grupos. O teste Two-way Anova mostrou diferenças significativas para as variáveis tratamento ( $F(1, 16) = 15,2$ ;  $p = 0,0013$ ), condição ( $F(1, 16) = 40,74$ ;  $p < 0,0001$ ) e a interação entre tratamento e condição ( $F(1, 16) = 5,713$ ;  $p = 0,0295$ ). O pós-teste de Sidak mostrou diferenças significativas entre os grupos VC vs RE, VC vs RE, RC vs RE e VE vs RE com  $p < 0,05$ .

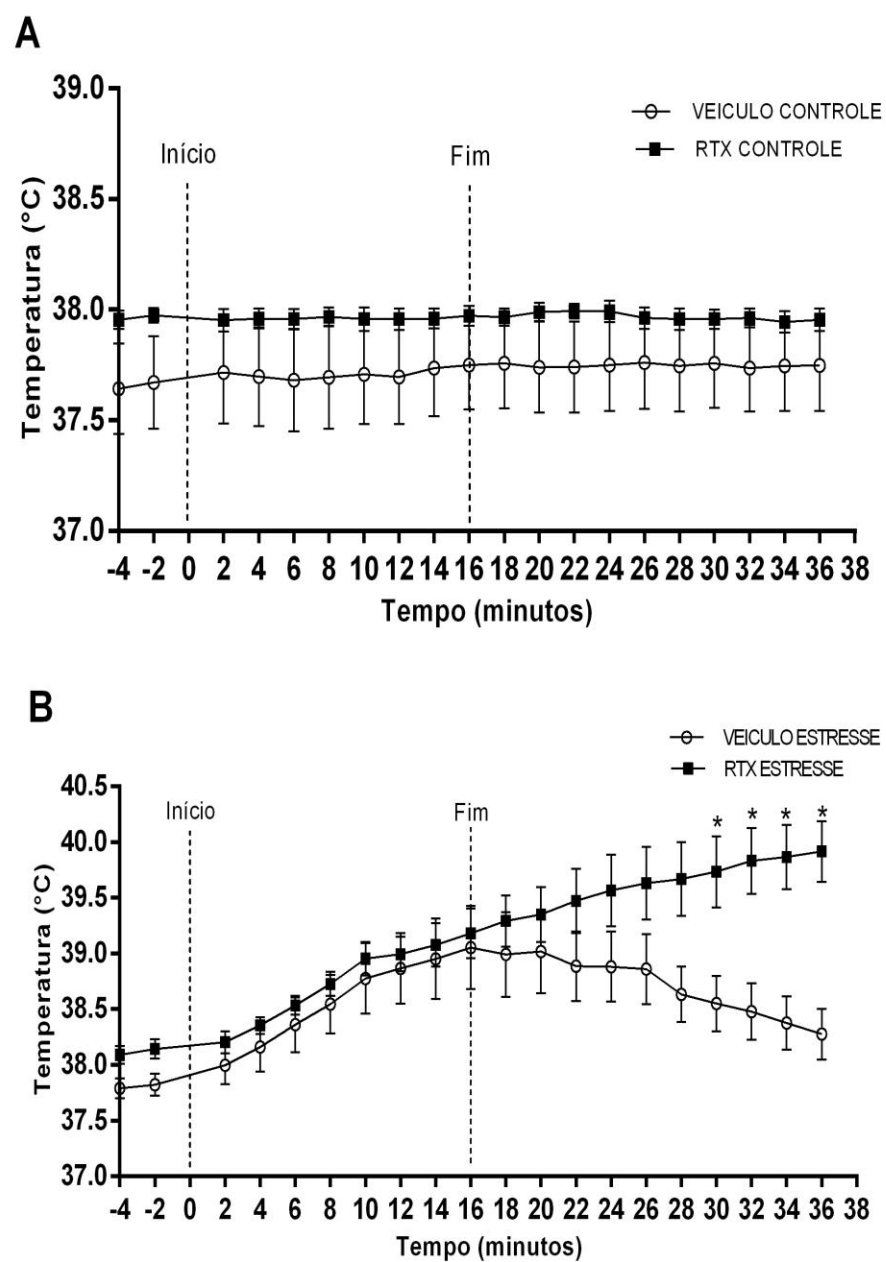


**Figura 17:** Alterações na temperatura do TAM (°C) evocadas pelo estresse social em ratos controle e dessensibilizados por RTX. (A) Delta do valor de maior variação da temperatura do TAM durante o estresse em relação aos 4 minutos pré-estresse. (B) Delta do maior valor de temperatura do TAM pós-estresse em relação aos 4 minutos iniciais pré-estresse. \* Diferença estatística do grupo RTX em relação ao grupo veículo controle. # Diferença estatística do grupo RTX estresse em relação ao RTX controle. & Diferença estatística do grupo RTX estresse em relação ao veículo estresse. Anova two way, com pós-teste Sidak ( $p < 0,05$ ).



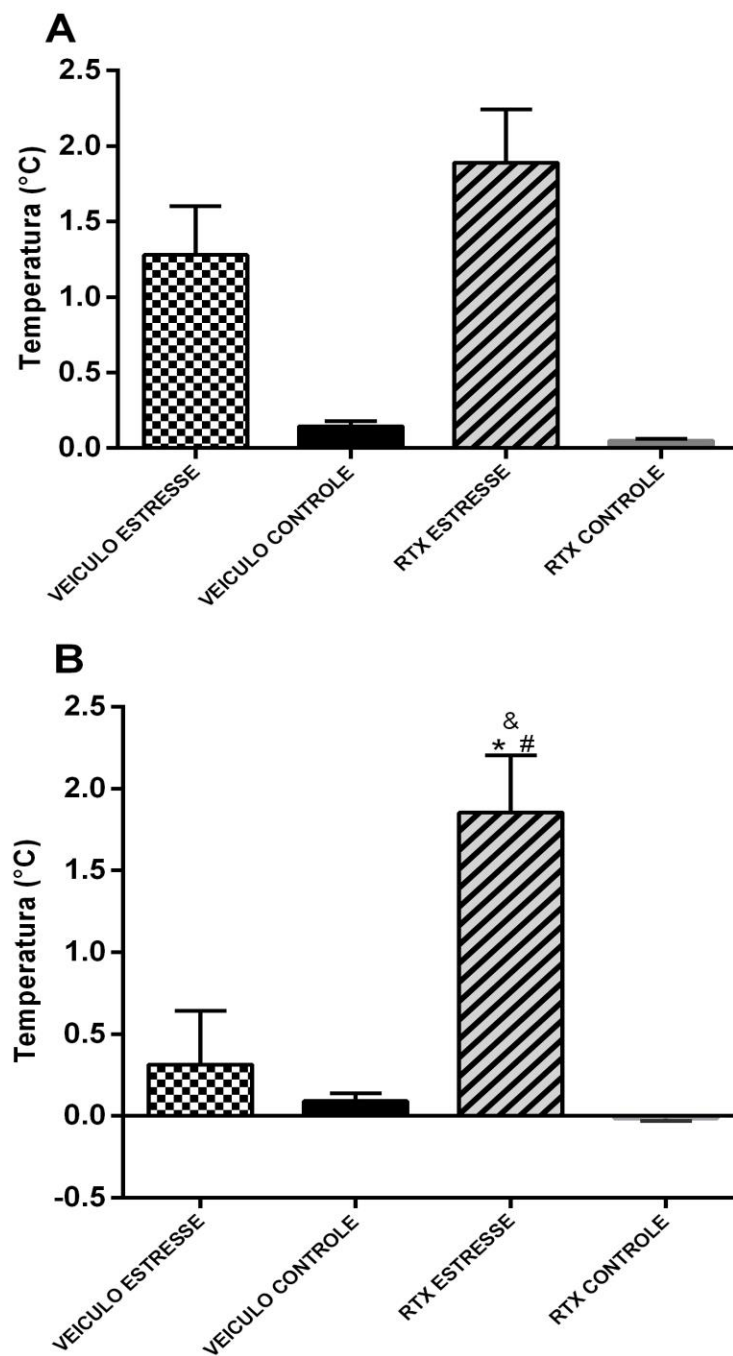
### **5.3 - Efeitos da dessensibilização dos receptores TRPV1 por RTX no controle da TCO de animais expostos ao estresse social**

A figura 18A representa os diferentes valores da TCO dos animais denominados controle, aqueles que não foram submetidos a exposição ao estresse social por rato intruso. O teste Two-way Anova não apresentou diferenças significativas para nenhuma das variáveis; tempo ( $F(19,152) = 1,778$ ;  $p = 0,2835$ ), tratamentos ( $F(1, 8) = 1,275$ ;  $p = 0,2916$ ) e interação entre tempo e tratamentos ( $F(19, 152) = 0,9059$ ;  $p = 0,5764$ ). A figura 18B representa os diferentes valores da TCO, antes, durante e após a exposição ao estresse social por rato intruso, nos animais tratados com RTX ou veículo. O teste Two-way Anova mostrou diferenças significativas para a variável tempo ( $F(19, 152) = 27,48$ ;  $p < 0,0001$ ), não sendo significativa para tratamentos ( $F(1,8) = 3,102$ ;  $p = 0,1162$ ), porém apresentou interação significativa entre tratamento x tempo ( $F(19, 152) = 8,706$ ;  $p < 0,0001$ ). O pós- teste de Sidak mostrou diferença significativa somente após o período de estresse, nos tempos 30, 32, 34 e 36 com  $p < 0,05$ .



**Figura 18:** Alterações nos valores de TCO (°C) antes, durante (linha tracejada) e após o estresse social. (A) Representa os diferentes valores de TCO entre os animais RTX controle e Veículo controle. (B) Representa os diferentes valores de TCO entre os animais RTX estresse e Veículo estresse. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. \* Diferença estatística do grupo RTX em relação ao Veículo. Anova two way, com pós-teste Sidak ( $p < 0,05$ ).

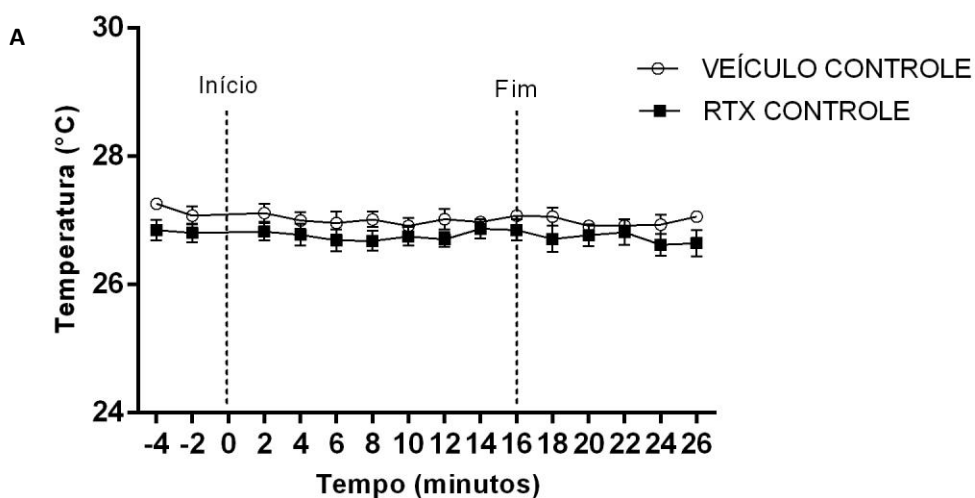
A figura 19A representa os valores de delta de maior variação da TCO (maior valor encontrado após início do estresse até o final menos a média dos valores de basal inicial) para todos os grupos. O teste Two-way Anova mostrou diferença significativa somente para a variável condição ( $F(1, 16) = 38,23$ ;  $p < 0,0001$ ), não sendo significativa para tratamentos ( $F(1, 16) = 1,160$ ;  $p = 0,2975$ ) e para a interação entre tratamentos e condição ( $F(1, 16) = 2,130$ ;  $p = 0,1638$ ). A figura 19B representa os valores de delta dos 4 minutos finais da TCO (média dos últimos 4 minutos menos a média dos valores de basal inicial) para todos os grupos. O teste Two-way Anova mostrou diferenças significativas para as variáveis tratamento ( $F(1, 16) = 8,846$ ;  $p = 0,0089$ ), condição ( $F(1, 16) = 18,79$ ;  $p = 0,0005$ ) e na interação entre tratamento e condição ( $F(1, 16) = 11,65$ ;  $p = 0,0036$ ). O pós-teste de Sidak mostrou diferenças significativas entre os grupos VC vs RE, RC vs RE e VE vs RE com  $p < 0,05$ .

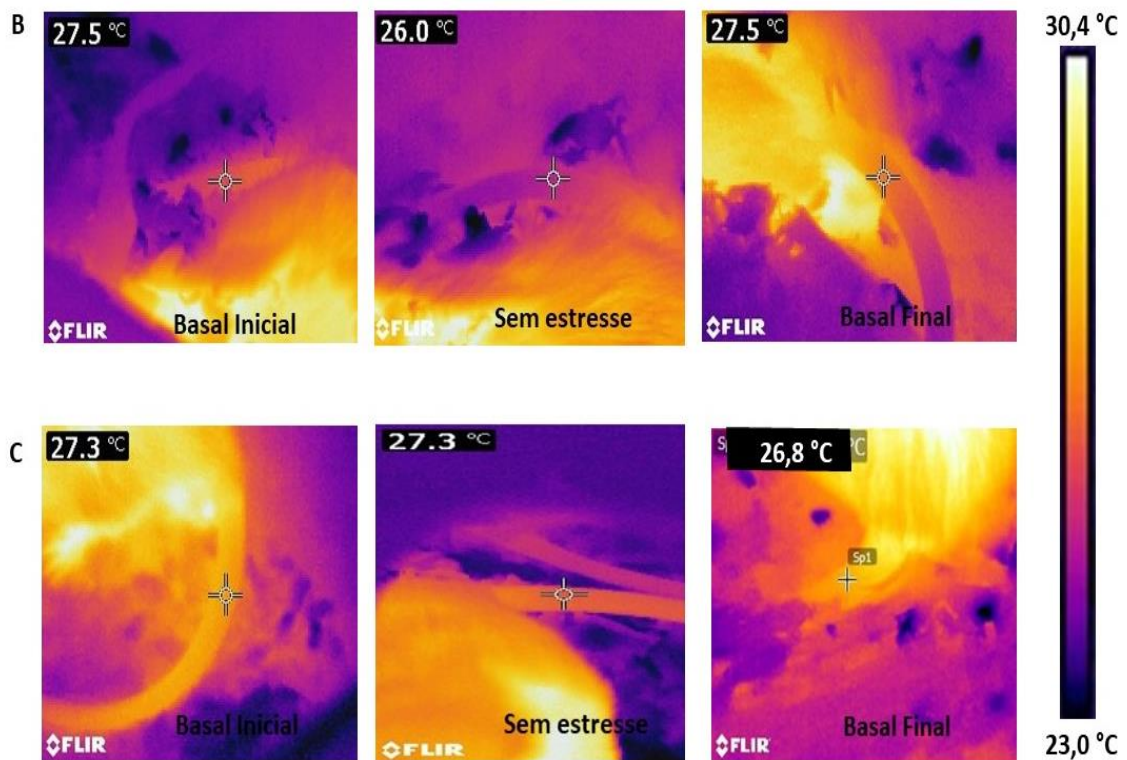


**Figura 19:** Alterações na TCO (°C) evocadas pelo estresse social em ratos controle e dessensibilizados por RTX. (A) Delta do valor de maior variação da TCO durante o estresse em relação aos 4 minutos pré-estresse. (B) Delta do maior valor da TCO pós-estresse em relação aos 4 minutos iniciais pré-estresse. \* Diferença estatística do grupo RTX em relação ao grupo veículo controle. # Diferença estatística do grupo RTX estresse em relação ao RTX controle. & Diferença estatística do grupo RTX estresse em relação ao veículo estresse. Anova two way, com pós-teste Sidak ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4 – Efeitos da dessensibilização dos receptores TRPV1 por RTX no controle da temperatura da cauda de animais expostos ao estresse social

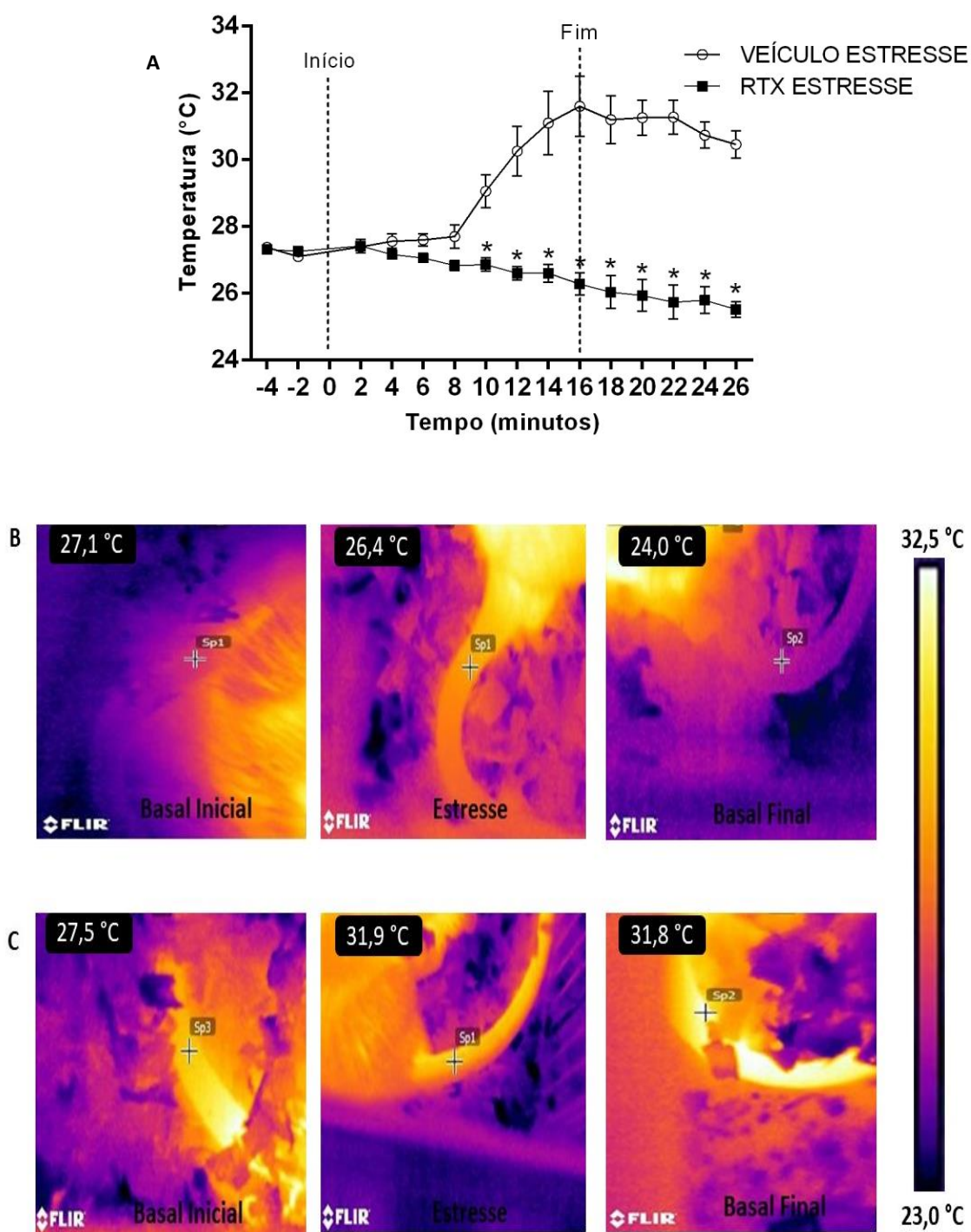
A figura 20A representa os valores de temperatura de cauda durante o período de experimento nos animais que não foram submetidos ao protocolo de estresse. O teste Two-way Anova não mostrou diferença significativa para nenhuma das variáveis; tempo ( $F(14, 112) = 1,207$ ;  $p = 0,2801$ ), tratamentos ( $F(1, 8) = 2,611$ ;  $p = 0,1448$ ) e interação entre tratamentos e tempo ( $F(14, 112) = 0,6063$ ;  $p = 0,8550$ ). A figura 20B são fotos infravermelho representativas da temperatura de cauda de animais RTX controle, que não foram submetidos ao estresse. A figura 20C são fotos infravermelho representativas da temperatura de cauda de animais Veículo controle, que não foram submetidos ao estresse. Essas imagens foram feitas utilizando a máquina fotográfica FLIR e os valores da temperatura das imagens foram analisadas através do programa FLIR Tools.





**Figura 20:** Efeito da dessensibilização de TRPV1, através da administração i.p. de RTX, na temperatura da cauda dos animais RTX controle, não submetidos ao estresse. (A) Valores de temperatura de cauda (°C) antes, durante (linha tracejada) e após nos animais não submetidos ao estresse social. (B) Representa os valores de temperatura de cauda dos animais RTX controle. (C) Representa os valores de temperatura de cauda nos animais veículo controle. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. As imagens infravermelho referem-se a animais representativos dos grupos RTX controle e Veículo Controle durante os experimentos. Nas imagens infravermelho, a cruz que está na foto indica o local de mensuração de temperatura (descrita no canto superior esquerdo da foto) naquele momento.

A figura 21A representa os valores da temperatura de cauda durante o período de experimento nos animais que foram submetidos ao protocolo de estresse. O teste Two-way Anova mostrou diferenças significativas para as variáveis tratamento ( $F(1, 8) = 57,54$ ;  $p < 0,0001$ ), tempo ( $F(14, 112) = 7,022$ ;  $p < 0,0001$ ) e na interação entre tratamento e tempo ( $F(14, 112) = 23,90$ ;  $p < 0,0001$ ). O pós-teste de Sidak mostrou diferenças significativas nos tempos de 2 a 26 minutos  $p < 0,05$ . A figura 21B são fotos infravermelho representativas da temperatura de cauda de animais RTX estresse, que foram submetidos ao estresse. A figura 21C são fotos infravermelho representativas da temperatura de cauda de animais Veículo estresse, que foram submetidos ao estresse. Essas imagens foram feitas utilizando a máquina fotográfica FLIR e os valores da temperatura das imagens foram analisadas através do programa FLIR Tools.

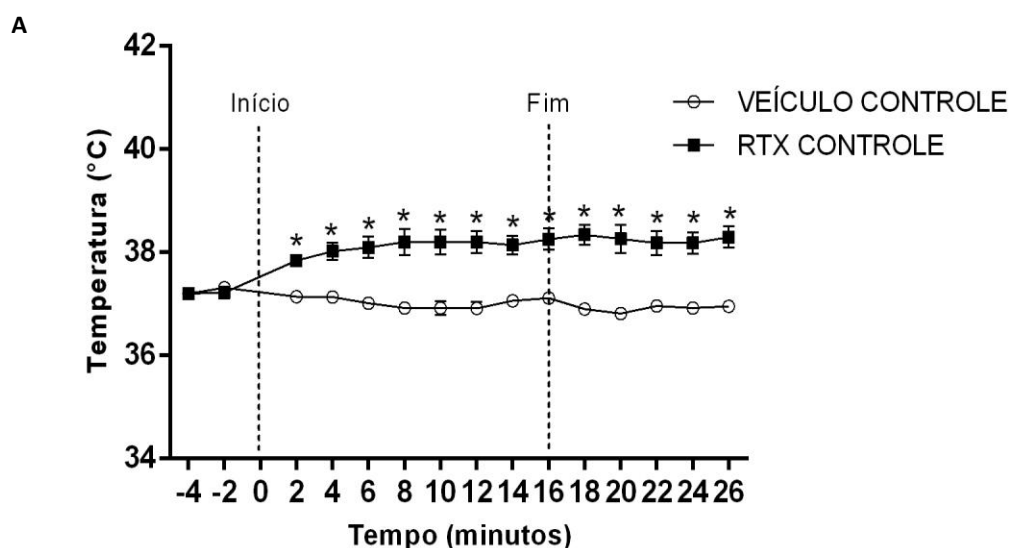


**Figura 21:** Efeito da dessensibilização de TRPV1, através da administração i.p. de RTX, na temperatura da cauda dos animais RTX estresse, submetidos ao estresse. (A) Valores de temperatura de cauda (°C) antes, durante (linha tracejada) e após nos animais RTX estresse e Veículo estresse, submetidos ao estresse social. (B) Representa os valores de temperatura de cauda dos animais RTX estresse. (C) Representa os valores de temperatura de cauda dos animais Veículo estresse. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. As imagens infravermelho referem-se a animais representativos dos grupos RTX estresse e Veículo estresse durante os experimentos. \* Diferença estatística do grupo RTX em relação ao Veículo. Anova two way, com pós-teste

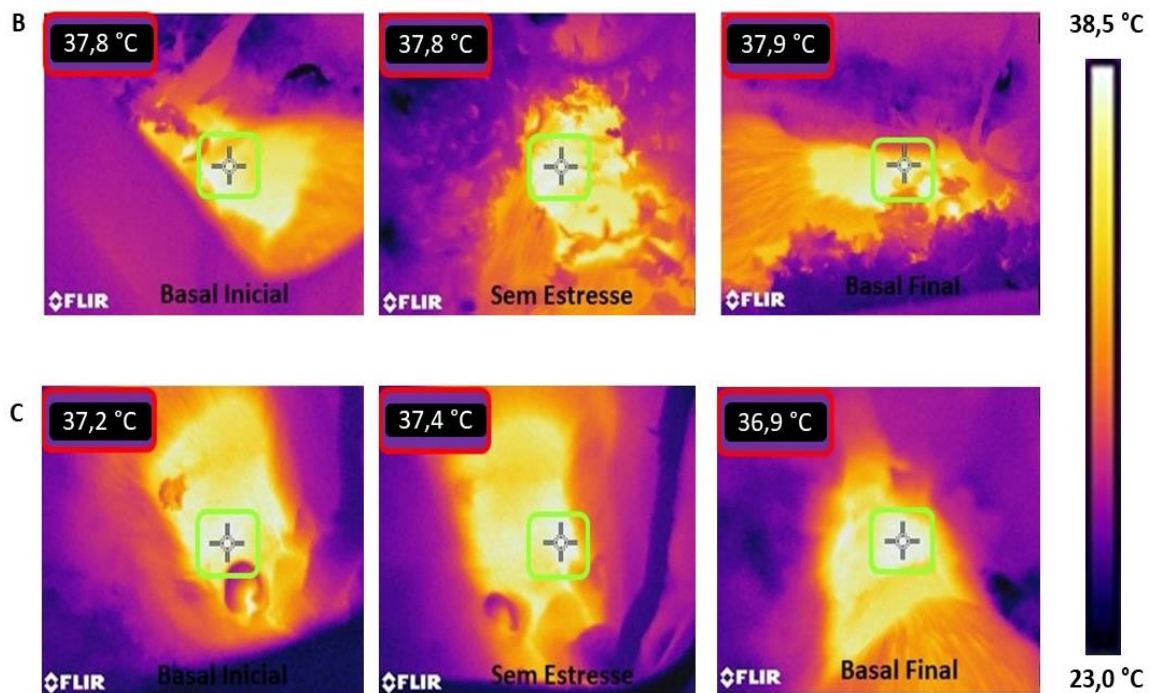
Sidak ( $p < 0,05$ ). Nas imagens infravermelho, a cruz que está na foto indica o local de mensuração de temperatura (descrita no canto superior esquerdo da foto) naquele momento.

### 5.5 – Efeitos da dessensibilização dos receptores TRPV1 por RTX no controle da temperatura do dorso de animais expostos ao estresse social

A figura 22A representa os valores de temperatura do dorso durante o período de experimento nos animais que não foram submetidos ao protocolo de estresse. O teste Two-way Anova mostrou diferença significativa para as variáveis; tempo ( $F(14, 112) = 2,992$ ;  $p = 0,0006$ ), tratamentos ( $F(1, 8) = 37,01$ ;  $p = 0,0003$ ) e interação entre tratamentos e tempo ( $F(14, 112) = 10,17$ ;  $p < 0,0001$ ). O pós-teste de Sidak mostrou diferenças significativas nos tempos de 2 a 26 minutos  $p < 0,05$ . A figura 22B são fotos infravermelho representativas da temperatura de cauda de animais RTX controle, que foram submetidos ao estresse. A figura 22C são fotos infravermelho representativas da temperatura de cauda de animais Veículo controle, que foram submetidos ao estresse. Essas imagens foram feitas utilizando a máquina fotográfica FLIR e os valores da temperatura das imagens foram analisadas através do programa FLIR Tools.

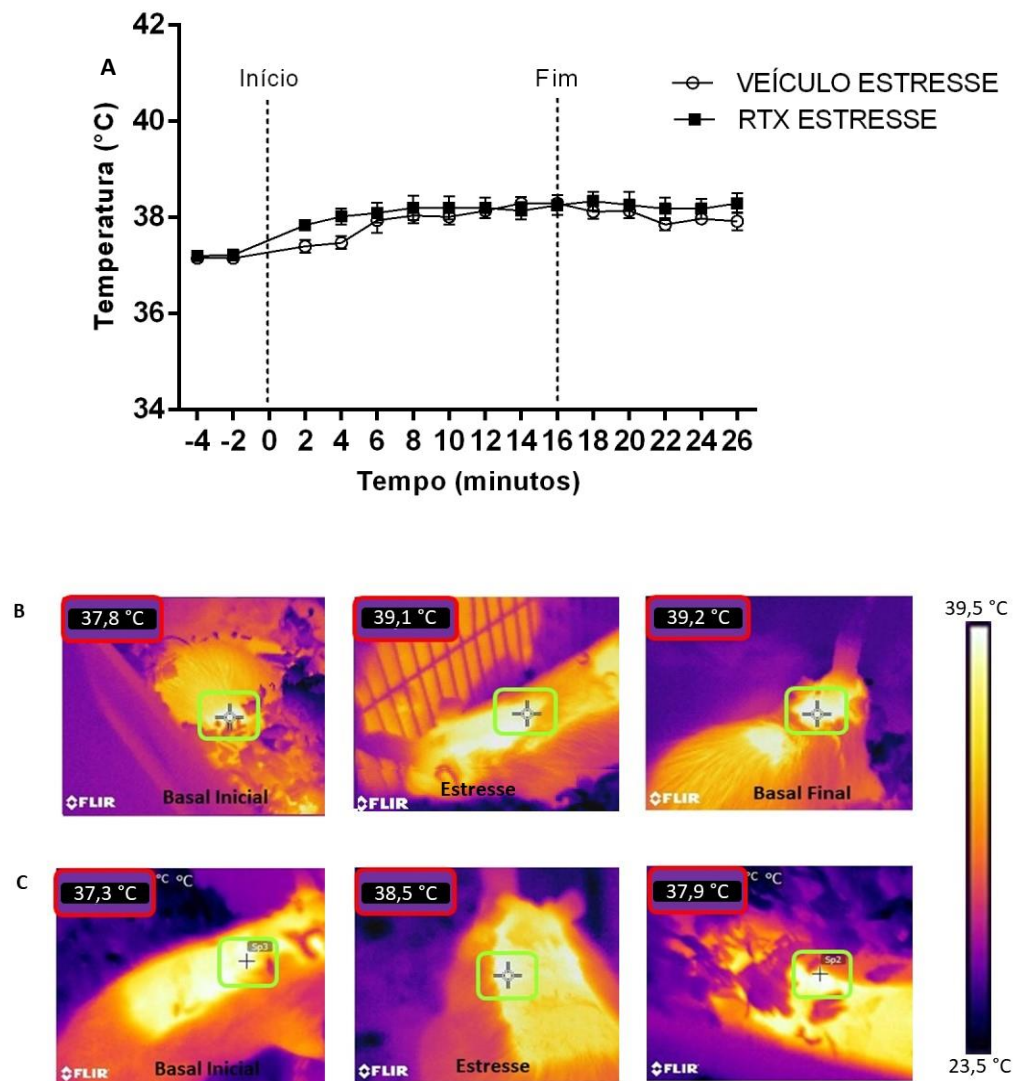






**Figura 22:** Efeito da dessensibilização de TRPV1, através da administração i.p. de RTX, na temperatura do dorso dos animais RTX controle, não submetidos ao estresse. (A) Valores de temperatura do dorso (°C) antes, durante (linha tracejada) e após nos animais não submetidos ao estresse social. (B) Representa os valores de temperatura do dorso dos animais RTX controle. (C) Representa os valores de temperatura do dorso nos animais veículo controle. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. As imagens infravermelho referem-se a animais representativos dos grupos RTX controle e Veículo Controle durante os experimentos. \* Diferença estatística do grupo RTX em relação ao Veículo. Anova two way, com pós-teste Sidak ( $p < 0,05$ ). Nas imagens infravermelho, a cruz que está na foto indica o local de mensuração de temperatura (descrita no canto superior esquerdo da foto) naquele momento.

A figura 23A representa os valores da temperatura do dorso durante o período de experimento nos animais que foram submetidos ao protocolo de estresse. O teste Two-way Anova mostrou diferenças significativas para as variáveis tratamento ( $F(1, 8) = 57,54$ ;  $p < 0,0001$ ), tempo ( $F(14, 112) = 7,022$ ;  $p < 0,0001$ ) e na interação entre tratamento e tempo ( $F(14, 112) = 23,90$ ;  $p < 0,0001$ ). O pós-teste de Sidak mostrou diferenças significativas nos tempos de 2 a 26 minutos  $p < 0,05$ . A figura 23B são fotos infravermelho representativas da temperatura de cauda de animais RTX estresse, que foram submetidos ao estresse. A figura 23C são fotos infravermelho representativas da temperatura de cauda de animais Veículo estresse, que foram submetidos ao estresse. Essas imagens foram feitas utilizando a máquina fotográfica FLIR e os valores da temperatura das imagens foram analisadas através do programa FLIR Tools.



**Figura 23:** Efeito da dessensibilização de TRPV1, através da administração i.p. de RTX, na temperatura do dorso dos animais RTX estresse, submetidos ao estresse. (A) Valores de temperatura do dorso (°C) antes, durante (linha tracejada) e após nos animais RTX estresse e Veículo estresse, submetidos ao estresse social. (B) Representa os valores de temperatura do dorso dos animais RTX estresse. (C) Representa os valores de temperatura do dorso dos animais Veículo estresse. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. As imagens infravermelho referem-se a animais representativos dos grupos RTX estresse e Veículo estresse durante os experimentos. Nas imagens infravermelho, a cruz que está na foto indica o local de mensuração de temperatura (descrita no canto superior esquerdo da foto) naquele momento.

## 6 - DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstramos que a dessensibilização dos canais TRPV1 (por RTX) provocou taquicardia, aumento na temperatura corporal e aumento na temperatura do tecido adiposo marrom (TAM) quando os animais foram expostos ao estresse social. Tais alterações foram similares nos animais do grupo veículo, não dessensibilizados. Porém, ao final do período de estresse, diferentemente dos animais veículo, os animais RTX não retornaram os parâmetros cardiovasculares, a temperatura corporal e a temperatura do TAM aos valores basais. No entanto, foi possível observar que a dessensibilização dos canais TRPV1, por si só, foi capaz de provocar um aumento da temperatura do TAM e da temperatura do dorso nos animais controle, não submetidos ao estresse. Ambos grupos de animais, RTX e veículo, não demonstraram diferença na temperatura do dorso durante o período de estresse. Além disso, demonstramos também que a dessensibilização dos canais TRPV1 (por RTX) diminuiu a temperatura caudal durante o período de estresse, variação esta, contrária ao grupo veículo, no qual observamos um aumento em tal temperatura. Tais resultados mostraram que os animais dessensibilizados para TRPV1 com RTX, não recuperam seus valores basais de temperatura após o período de estresse. Sendo assim, nosso estudo sugere que o TRPV1 é um receptor importante para a recuperação da temperatura após período de estresse.

Após a dessensibilização dos canais TRPV1, observamos que tal dessensibilização diminuiu a temperatura caudal durante o estresse social. A cauda é um tecido altamente vascularizado e representa 7% da área de superfície corporal total dos ratos (GORDON, 1990) permitindo que ocorra uma modificação do fluxo sanguíneo durante situações de estresse térmico. A vasodilatação da cauda é responsável pela dissipação de cerca de 25% da produção de calor em repouso e por cerca de 40% durante o exercício (YOUNG e DAWSON, 1982). Nossos dados mostraram a dificuldade apresentada pelos animais RTX em dissipar calor pela cauda, o que corrobora os resultados encontrados por Obál et al. (1983), onde os pesquisadores observaram que o aumento da dissipação de calor na pele da cauda e as respostas autonômicas estavam claramente comprometidas nos animais dessensibilizados para os canais TRPV1. Essa resposta é observada porque, apesar de existir sete canais TRPs que respondem aos aumentos de temperatura, apenas dois deles estão presentes nos queratinócitos da pele ou nas

terminações nervosas livres da pele, sendo eles TRPV1 e TRPV4 (CATERINA et al., 2007). Portanto, podemos sugerir que o canal TRPV1 é muito importante para garantir a manutenção e regulação do controle de temperatura durante as situações de estresse, pois na falta do TRPV1, o TRPV4 não seria capaz de supri-la e controlar as variações de temperatura. Além disso esse resultado confirma que nosso modelo foi efetivo em produzir a dessensibilização dos canais TRPV1.

Com a dessensibilização dos canais TRPV1, foi possível observar um aumento na FC durante o período de estresse, a qual manteve-se elevada e não retornou aos valores basais. Diante situações de estresse, o sistema nervoso central de mamíferos produz respostas de defesa caracterizadas por um padrão integrado de alterações endócrinas, autonômicas e comportamentais (CLARK et al., 1997). Tais respostas envolvem aumento de vários parâmetros fisiológicos dentre eles a FC. Diversos trabalhos demonstraram que diferentes tipos de estresse agudo evocam aumento nos valores de FC (DE MENEZES et al., 2008; MESQUITA et al., 2016; ABREU et al., 2014; DIMICCO et al., 1996), isso porque durante situações estressantes há uma alteração da atividade barorreflexa, provocando tal aumento (CRESTANI et al., 2010). No nosso entendimento, é a primeira vez que se é investigado a dessensibilização de TRPV1, através da injeção intraperitoneal de RTX, e seus efeitos sobre o aumento de FC durante estresse emocional. Porém, estudos mostraram que a dessensibilização de TRPV1, por capsaicina, um análogo do RTX, feita especificamente na região cerebral córtex pré-frontal ventromedial (vMPFC), aumenta a resposta taquicárdica à estimulação barorreflexa (LAGATTA et al., 2015). Além disso, Sun (2009) mostraram que ratos tratados com injeção intraperitoneal de RTX tiveram uma diminuição significativa na capacidade do barorreflexo arterial em reduzir a FC. Estes dados sugerem que o TRPV1 seria um canal importante no controle de FC frente a situações adversas.

Nos animais dessensibilizados com RTX, foi possível observar um aumento na TCO durante o período de estresse, a qual manteve-se elevada e não retornou aos valores basais. Esta elevação da TCO só ocorre quando os animais são estimulados, como podemos observar nos animais dessensibilizados que não foram submetidos ao estresse social, pois eles mantiveram seus valores de TCO, durante todo o período experimental. A temperatura corporal de animais homeotérmicos é mantida constante através de mecanismos muito precisos que fazem o controle da dissipação e produção necessária de calor interno. Em resposta ao aumento de temperatura corporal interna acima de valores basais, acontece a dissipação de calor, que vai provocar aumento na taxa respiratória

desses animais (Clapham, 2012). Estudos apontam evidências de que o estresse consegue afetar o sistema termorregulatório induzindo alterações na temperatura corporal (VINKERS et al., 2013). Outros trabalhos também demonstraram que os animais apresentavam um aumento na temperatura corporal após serem expostos a diferentes situações de estresse (BORSINI et al., 1989). Não há indícios na literatura de outros estudos que avaliaram a dessensibilização de TRPV1, através da injeção intraperitoneal de RTX, e seus efeitos sobre o aumento da TCO durante estresse emocional. No entanto, desde 1970 estudos têm demonstrado os efeitos da dessensibilização dos receptores TRPV1, onde observaram que animais tratados com RTX apresentam maior aumento de temperatura interna durante a exposição a ambientes quentes quando comparado com os animais não dessensibilizados (JANCSO-GÁBOR et al., 1970 a, b; SZIKSZAY et al., 1982; COMARECHE et al., 1985; SZALLASI e BLUMBERG, 1989). Kunstetter (2013), em sua dissertação, sugeriu que a redução no número de neurônios ou canais TRPV1 ativos na cavidade abdominal levou à redução na capacidade de controlar a temperatura interna durante o exercício, dificultando a manutenção do equilíbrio térmico. Estes dados em conjunto com nossas observações sugerem que o TRPV1 seria um canal importante na manutenção e regulação destes aumentos da TCO frente a situações adversas.

Foi possível observar nos animais dessensibilizados com RTX, um aumento na temperatura do TAM durante o período de estresse, a qual manteve-se elevada e não retornou aos valores basais. Diferentemente da TCO, em que a elevação da temperatura só ocorre quando os animais são estimulados, no TAM os animais dessensibilizados apresentaram uma temperatura aumentada, mesmo não sendo estimulados pelo estresse social. O TAM é responsável pela termogênese independente de tremor em mamíferos e sua ativação é de grande importância para a produção de calor através de mecanismos facultativos, ou seja, mecanismos adicionais para produção rápida de calor (CLAPHAM, 2012; MACKOWIAK, 1998). Nakamura e Morrison (2008) descreveram em sua via, sobre a vasoconstricção e a produção de calor por tremor ou pelo tecido adiposo marrom como mecanismos modulados por uma área específica no cérebro. Vários estudos demonstraram a expressão dos canais TRPV1 no TAM, deixando mais claro porque o bloqueio destes canais pode levar a quadros de hipertermia (GAVVA et al., 2008; YONESHIO e SAITO, 2013; VENNEKENS et al., 2008). Estudos de Yamashita (2008) verificaram que na presença de antagonista para o TRPV1, a expressão de UCP1 diminui significativamente. Mais uma vez, em nosso entendimento, é a primeira vez que se é investigado a dessensibilização de TRPV1, através da injeção intraperitoneal de RTX, e seus efeitos

sobre o aumento da temperatura do TAM durante estresse emocional. Atualmente muito pouco se sabe sobre as vias de ativação e inibição responsáveis pelo controle da temperatura durante mecanismos comportamentais e de estresse, por isso muitos estudos ainda são necessários nesta área.

Com a dessensibilização dos canais TRPV1 por RTX, observamos um aumento da temperatura da pele do dorso dos animais que não foram submetidos ao estresse social (controle). Já nos animais dessensibilizados submetidos ao estresse, observamos uma temperatura similar aos animais controle, porém a mesma não sofreu alteração no período de estresse. Tal padrão não foi observado nos animais tratados com veículo, os quais apresentaram um aumento na temperatura do dorso durante período de estresse, chegando a valores similares à temperatura dos animais RTX (expostos ou não ao estresse). Estudos de Rowell (1969, 1977) demonstraram que, sob estresse térmico severo, cerca de 50% do débito cardíaco pode ser direcionado para a pele, auxiliando no controle da vasculatura cutânea. Em quadros de hipertermia, a dissipação do calor ocorre principalmente pela vasodilatação sanguínea para a pele e cauda (RODRIGUES e SILAME-GARCIA, 1998). Estudos demonstraram a presença dos canais TRPV na pele (VAY et al., 2012), e também que os canais TRPV1 são altamente ricos em neurônios primários aferentes que inervam a pele e os órgãos viscerais (ROMANOVSKY et al., 2009). Apesar dos nossos últimos dados citados acima, de que a temperatura do dorso dos animais RTX está aumentada por si só, não podemos afirmar que seja um aumento na temperatura da pele propriamente dita, ou se seria uma influência do TAM, já que este apresentou-se aumentado nesses animais e se situa exatamente abaixo do dorso.

## **7 - CONCLUSÃO**

Nossos resultados mostraram que os animais dessensibilizados para TRPV1 não foram capazes de dissipar calor pela cauda e restaurar seus valores basais de frequência cardíaca e temperatura corporal após período de estresse, além de apresentaram uma elevada temperatura do tecido adiposo marrom por si só, independente do estresse. Sendo assim, nosso estudo sugere que o TRPV1 é um canal de suma importância no controle e manutenção da temperatura diante situações adversas.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSANDRI-HABER, N. et al. A transient receptor potential vanilloid 4-dependent mechanism of hyperalgesia is engaged by concerted action of inflammatory mediators, **J. Neurosci.**, v. 26, p. 3864–3874, 2006.

ABREU, A. R. et al. Blunted GABA-mediated inhibition within the dorsomedial hypothalamus potentiates the cardiovascular response to emotional stress in rats fed a high-fat diet. **Neuroscience**, v. 262, p. 21-30, 2014.

BANET, M. et al. The central control of shivering and non-shivering thermogenesis in the rat. **J. Physiol.**, v: 283, p. 569-584, 1978.

BARON, D.M. et al. In vivo noninvasive characterization of brown adipose tissue blood flow by contrast ultrasound in mice circulation. **Cardiovascular Imaging.**, 5, p. 652-659, 2012.

BENNETT, A.F. Temperature and muscle. **J. Exp. Biol.**, 115, p. 333-344, 1985.

BJORKQVIST, K. Social defeat as a stressor in humans. **Physiol Behav.**, 73, p. 435-442, 2001.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **J. Comp. Psychol.**, v. 103, n. 1, p. 70-82, Mar. 1988a.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry**, v.13, p. S3-14, 1989b.

BLESSING, W. e LOMU, M. Lab Guide: How to make head socket and thermistor probes – Human Physiology. **Blessing Lab**, version 2, July 2009.



BLESSING, W. et al. Brown adipose tissue thermogenesis, the basic rest-activity cycle, meal initiation, and bodily homeostasis in rats. **Physiol Behav**, 121, p. 61-69, 2013.

BLESSING, W. et al. Control of the cutaneous circulation by the central nervous system. **Comprehensive Physiology**, 6, p. 1161-1197, 2016.

BORSINI, F. et al. Discovery of antidepressant activity by forced swimming test may depend on pre-exposure of rats to a stressful situation. **Psychopharmacology**, v. 97, p. 183-8, 1989.

BUKOWIECKI, L, et al. Brown adipose tissue hyperplasia: A fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia. **Am. J. Physiol**, v. 242, p. E353-E359, 1982.

BUKOWIECKI, L, et al. Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation. **Am. J. Physiol Cell Physiol**, v. 250, p. C880-C887, 1986.

CABANAC, A. J. et al. Temperature and heart rate as stress indicators of handled common eider. **Physiol Behav.**, v. 74, p. 475- 479, 2000.

CANNON, W.B. Bodily changes in pain, hunger fear and rage: an account of recent researches into the function of emotional excitement. **New York**, 1929.

CANNON, W.B. and NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance **Physiological Reviews**, v. 84, p. 277-359, 2004.

CATERINA, M.J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.

CATERINA, M.J. et al. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. **Nature**, v. 398, p. 398-436, 1999.

CATERINA, M.J. et al. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation

CATERINA, M.J. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 292 (1), p. R64-R76, 2007.

CHROUSOS, G.P. Stress and disorders of the stress system. **Nat.Rev.Endocrinol**, v. 5, p. 374-381, 2009.

CLARK, J. D. et al. Animal well-being. II. Stress and distress. **Lab Anim Sci**, v. 47, n. 6, p. 571-9, Dec. 1997

CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. **Nature**, v.426 p.517–524. 2003

CLAPHAM, D.E. et al. International Union of Pharmacology. L. Nomenclature and structure-function relationships of CatSper and two-pore channels. **Pharmacol Rev.**, v. 57 (4), p. 451- 454, 2005.

CLAPHAM, D.E. et al. Analysis of the selectivity filter of the coltage-gated sodium channel Na(v)Rh. **Cell Res.**, v. 23(3), p. 409-422, 2012.

CORMARECHE-LEYDIER, M.; SHIMADA, S. G.; STITT, J. T. Hypothalamic thermosensitivity in capsaicin-desensitized rats. **Journal of. Physiology**, v.363, p.227-236, 1985.

COUSIN, B. et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. **Journal of Cell Science.**, v. 103, p. 931-942, 1992.

CYPESS, A.M. et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **N Engl J Med**, v. 360, p. 1509-1517, 2009.

CZAJA, K. et al. Capsaicin-induced neuronal death and proliferation of the primary sensory neurons located in the nodose ganglia of adult rats. **Neuroscience**, v.154, p.621–630, 2008.

DE MENEZES, R. C. et al. Microinjection of muscimol into the periaqueductal gray suppresses cardiovascular and neuroendocrine response to air jet stress in conscious rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 295, n. 3, p. R881-90, Sep 2008.

DEVANE, W. A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-1949, 1992.

DIMICCO, J.; MONROE, A. J. Stimulation of metabotropic glutamate receptors in the dorsomedial hypothalamus elevates heart rate in rats. **Am. J. Physiol**, v. 270, p. R1115-1121, 1996.

DI MARZO, V.; DEUTSCH, D. G. Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. **Neurobiol Dis.**, v. 5, p. 386-404, 1998.

DOGAN, M. D. et al. Lipopolysaccharide fever is initiated via a capsaicin-sensitive mechanism independent of the subtype-1 vanilloid receptor. **British Journal of pharmacology**, v. 143, p. 1023-1032, 2004.

DRAY, A. Neuropharmacological mechanisms of capsaicin and related substances. **Biochem Pharmacol**, v. 44, p. 611-616, 1992.

EVERLY, G.S. A Clinical Guide to the treatment of the human stress response. **Plenum Press**, New York, 1990.

FIRTH, A.L. et al. TRP Channels in Hypertension. **Biochim Biophys Acta**, v. 1772, n.8, p. 895-906, 2007.

GAO, B. et al. A Repeated immobilization stress increases uncoupling protein 1 expression and activity in Wistar rats. **Jpn J Physiol**, v. 53, p. 205-21, 2003.

GARCIA-SANZ, N. et al. Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 23, p. 5307-5314, Jun 2004.

GAVVA, N. R. *et al.* Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits

marked hyperthermia in humans. **Pain**, v.136, n.1-2, p.202-210, 2008.

GORDON, C.J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 5, p. 963- 991, Mai. 1990.

GREEN, B. G. Capsaicin sensitization and desensitization on the tongue produced by brief exposures to a low concentration. **Neurosci Lett**, v. 107, p. 173-190, 1989.

GULER, A.D. et al. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. **J Neurosci**, v. 22, p. 6408–6414, 2002.

HARDIE, R. C.; MINKE, B. The trp gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in Drosophila photoreceptors. **Neuron**, v.8, p. 643–651, 1992.

HARRISON, S. et al. Capsaicin-like effects of N-arachidonoyl-dopamine in the isolated guinea pig bronchi and urinary bladder. **European Journal of Pharmacology**, v. 475, n. 1-3, p. 107-114, Aug 2003.

HAYES, A. G. et al. The depolarising action of capsaicin on rat isolated sciatic nerve. **Life Sci**, v. 35, p. 1561-1569, 1984.

HELLWING, N. et al. Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. **J. Cell Sci.**, v. 118, pt. 5, p. 917-928, 2005.

HETEM, R. S. et al. Cheetah do not abandon hunts because they overheat. **Biol Lett**, v. 9(5), p. 20130472, 2013.

HEATON J. The distribution of brown adipose tissue in the human. **J. Anat.**, v. 112(1), p. 35-39, 1972.

HIMMS-HAGEN, J. Role of thermogenesis in the regulation of energy balance in relation to obesity. **Can. J. Physiol Pharmacol**, v. 67(4), p. 394-401, 1989a.

HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. *Prod Lipid Res* 28, 67-115, 1989 b.

HOLZER, P. The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nocisensor. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 8, p. 1145-1162, Dec 2008.

HWANG, S. W. et al. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: Endogenous capsaicin-like substances. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 11, p. 6155-6160, May 2000.

JANCSO, G. et al. Selective degeneration by capsaicin of a subpopulation of primary sensory neurons in the adult rat. *Neuroscience Letters*, v.59, p.209-214, 1985.

JANCSO, G. et al. Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat- sensitive structures by capsaicin in rats. **J. Physiol.**, v. 208 (2), p. 449-459, 1970.

JANCSO, G.; LAWSON, S. N. Transganglionic degeneration of capsaicin-sensitive c-fiber primary afferent terminals. **Neuroscience**, v. 39, n. 2, p. 501-511, 1990.

JORDT, S. E.; JULIUS,D. Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. **Cell**, v. 108, n. 3, p. 421-430, 2002.

JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, 29

JULIUS, D.; NATHANS, J. Signaling by Sensory Receptors. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, 4, 2012.

KARAI, L.J. et al. Vanilloid receptor 1 regulates multiple calcium compartments and contributes to Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in sensory neurons. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 16377–16387, 2004.

KATAOKA, N. and Nakamura, K. Direct pathway from ventral medial prefrontal cortex to dorsomedial hypothalamus drives psychological stress-induced hyperthermia. *The FASEB Journal*, v. 30, p. 994-992, 2016.

KEDEI, N et al. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J. Biol. Chem.*, v. 276, n. 30, p. 28613-28619, 2001.

KEENEY, A. et al. Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. *J Neuroendocrinol*, v. 18, p. 330–338, 2006.

KNOTKOVA, H. et al. A capsaicina (agonista TRPV1) terapia para o alívio da dor: despedida ou avivamento? *Clin. J. Dor.*, v. 24, p. 142 – 154, 2008.

KOOLHAAS, J.M. et al. Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand.Suppl* v. 640, p. 69-72, 1997.

KREBS, J.R. et al. Introdução à ecologia comportamental. **São Paulo: Atheneu**, 1996.

KUNSTETTER, A. C. *O aumento da temperatura cerebral induzido pelo exercício físico é exacerbado na ausência crônica dos canais trpv1 abdominais*. 2013. 112 f. (**Mestrado em Educação Física**) - **Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional, Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2013.

LAGATTA, D.C et al. Medial prefrontal cortex TRPV1 channels modulate the baroreflex cardiac activity in rats. *Br. J. Pharmacol*, v. 172(22), p. 5377-89, 2015.

LATORRE, R. et al. Thermo TRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium*, v. 42, n. 4-5, p. 427–438, 2007.

LATORRE, R. et al. Structure-funcional intimacies of transiente receptor potencial channels. *Quarterly Reviews of Biophysics*, v. 42(3), p. 201-246, 2009.

LIAP, A.; WOOD, J. N. Extensive co-localization and heteromultimer formation of the vanilloid receptor-like protein TRPV2 and the capsaicin receptor TRPV1 in the adult rat cerebral cortex. **Eur. J. Neurosci.**, v. 22, n. 4, p. 825-834, 2005.

LISHKO, P. V. et al. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. **Neuron**, v. 54, n. 6, p. 905-918, Jun 2007.

LIU, B. Y. et al. Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 19, p. 4835-4843, May 2005.

LKHAGVASUREN B, Nakamura Y, Oka T, Sudo N, Nakamura K. Social defeat stress induces hyperthermia through activation of thermoregulatory sympathetic premotor neurons in the medullary raphe region. **Eur J Neurosci**, v. 34, p. 1442–1452, 2011.

LUKACS, V. et al. Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 26, p. 7070-7080, Jun 2007.

LUKACS, V. et al. Promiscuous activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels by negatively charged intracellular lipids: the key role of endogenous phosphoinositides in maintaining channel activity. **J. Biol. Chem.**, 288, pp. 35003-35013, 2013.

LUO1, Z. et al. TRPV1 activation improves exercise endurance and energy metabolism through PGC-1 $\alpha$  up regulation in mice. **Cell Research**, v.22, n.3, p.551-564, 2011.

MAGGI, C. A. et al. Similarities and differences in the action of resiniferatoxin and capsaicin on central and peripheral endings of primary sensory neurons. **Neuroscience**, v. 37, n. 2, p. 531-539, 1990.

MANDADI, S. et al. Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. **Cell Calcium**, v. 35, n. 5, p. 471-478, May 2004.

MARKS, A. et al. Nonshivering thermogenesis without interscapular brown adipose tissue involvement during conditioned fear in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296, p. R1239-R1247, 2009.

MAYOROV, D.N. Brain angiotensin AT1 receptors as specific regulators of cardiovascular reactivity to acute psychoemotional stress. **Clin.Exp.Pharmacol.Physiol**, v. 38, p. 126-135, 2011.

MCGARAUGHTY, S. et al. Capsaicin infused into the PAG affects rat tail flick responses to noxious heat and alters neuronal firing in the RVM. **J Neurophysiol**, v. 90, p. 2702-2710, 2003.

MCKEMY, D. D. et al. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**, v.416, p.52–58, 2002.

MESQUITA, L. T. et al. New insights on amygdala: Basomedial amygdala regulates the physiological response to social novelty. **Neuroscience**, v. 330, p. 181-190, Aug 25 2016.

MEZZALIRA, N. Efeito da luz e temperatura sobre a expressão dos genes do relógio biológico em mamífero: tecidos periféricos como modelo de estudo/ Nathana Mezzalira; orientadora Ana Maria de Lauro Castrucci. – São Paulo, 2015.

MEZEY, E. et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, p. 3655-3660, 2000.

MINKE, B. Drosophila mutant with a transducer defect. **Biophys Struct Mech**, v.3, p. 59–64, 1977.

MINKE, B.; COOK, B. TRP Channel Proteins and Signal Transduction. **Physiol Rev**, v.82, p. 429–472, 2002.



MOHAMMED, M. Inactivation of neuronal function in the amygdaloid region reduces tail artery blood flow alerting responses in conscious rats. **Neuroscience**, v. 228, p. 13–22, 2013.

MOHAMMED, M. Brown adipose tissue thermogenesis contributes to emotional hyperthermia in a resident rat suddenly confronted with an intruder rat. **Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol**, v. 306, p. R394–400, 2014.

MOHAPATRA, D. P.; NAU, C. Regulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 14, p. 13424-13432, Apr 2005.

MONTELL, C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE* re3, 2005

MONTELL, C et al. A unified for the superfamily of TRP cation channels. **Mol Cell**, v. 9 (2), p. 229-231, 2002.

MONTELL, C. et al. The TRP channels, a remarkably functional family. **Cell**, v. 22 (9), p. 3463- 3472, May. 2002.

MONTELL, C.; RUBIN, G. M. Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. **Neuron**, v.2 p.1313–1323, 1989.

MOTTA S.C. et al. Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 106, p. 4870- 4875, 2009.

NAKAMURA, K. Neural circuit for psychological stress-induced hyperthermia. **Temperature**, v. 2, p. 352–361, 2015.

NAKAMURA, K. et al. Central control of thermogenesis in mammals. **Exp Physiol**, v. 93, n. 7, p. 773-797, 2008.

NEUBERT, J.K. Periféricamente induzida resiniferatoxina analgesia. **Dor**, v.104, p. 219-228, 2003.

NIJENHUIS, T. et al. TRPV5 e TRPV6 in Ca<sup>2+</sup> (re)absorption: regulating Ca<sup>2+</sup> entry at the gate. **Pflugers Arch.**, v. 451 (1), p. 181-92, 2005.

NILIUS, B.; OWSIANIK, G. The transient receptor potential family of ion channels. **Genome Biology**, v. 12(3), p. 218, 2011.

NOLANO, M. SIMONE, D. A. Topical Capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. **Pain**, v. 81, p. 134- 145, 1999.

NUMAZAKI, M. et al. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 13, p. 8002-8006, Jun 2003.

OBÁL, F. Jr.; OBÁL, F.; BENEDEK, G.; JANCSON-GÁBOR, A. Central and peripheral impairment of thermoregulation after capsaicin treatment. **Journal of thermal Biology**, v. 8, p. 203-206, 1983.

OOTSUKA, Y.;BLESSING, W. W. *et al.* Selective blockade of 5-HT<sub>2A</sub> receptors attenuates the increased temperature response in brown adipose tissue to restraint stress in rats. **Stress**, v. 11, n. 2, p. 125-33, 2008.

OOTSUKA, Y. et al. Brown adipose tissue thermogenesis heats brain and body as part of the brain-coordinated ultradian basic rest-activity cycle. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p.849-861, dez. 2009.

PAPAKOSTA, M. et al. A abordagem quimérica revela que as diferenças no domínio dos poros TRPV1 determinar a sensibilidade específica da espécie de bloco de ativação por calor. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 39663 – 39672, 2011.

PEIER, A.M. et al. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. **Science**, v. 296, p. 2046– 2049, 2002a.

PEIER, A.M. et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**, v. 108, p. 705–715, 2002b.

PHILLIPS, A. M. et al. Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. **Neuron**, v. 8, p. 631–642, 1992.

RODRIGUES, L. O.; SILAME-GARCIA, E. Fadiga: falha ou mecanismo de proteção. **In: (Ed.). Temas Atuais III. Belo Horizonte: Livraria e Editora Saúde Ltda**, v.3, p.27-48, 1998.

ROHACS, T. Regulation of transient receptor potential channels by the phospholipase C pathway. **Adv Biol Regul.**, v. 53(3), p. 341-55, 2013.

ROMANOVSKY, A.A.; IVANOV, A.I.; SHIMANSKY, Y.P. Selected contribution: Ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 6, p. 2667-2679, jun. 2002.

ROMANOVSKY, A.A.; ALMEIDA, M.C.; GARAMI, A.; STEINER, A.A.; NORMAN, M.H.; MORRISON, F. The transient receptor potential anilloid- channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. **Pharmacol**, v. 61, p. 71-84, 2009.

ROWELL, L. B. Reflex control of the cutaneous vasculature. **J. Invest. Dermatol.**, v. 69(1), p. 154-166, 1977.

ROWELL, L. B. et al. Cardiovascular responses to sustained high skin temperature in resting man. **J. Appl. Physiol.**, v. 27 (5), p. 673-680, 1969.

SCHAEFER, M. Homo-and heteromeric assembly of TRP channel subunits. **Pflugers Arch** v. 45, p.35-42, 2005

SCHARENBERG, A. M.; SCHULTZ, G.; SHIMIZU, N.; ZHU, M. X. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. **Mol. Cell** 9, 229-231, 2002.

SCHUMACHER, M. A. Transient receptor potential channels in pain and inflammation therapeutic opportunities. **Pain Pract**, v. 10, p. 185 – 200, 2010.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, p. 32, 1936.

SHIBASAKI, K. et al. Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4. **J Neurosci**, v. 27, p. 1566–1575, 2007.

SHIBASAKI, K. Brain temperature is a critical determinant of neuronal excitability through TRPV4 activation. **In: 37th Congress of IUPS**. Birmingham, AL: 2013

SILVA, C. et al. The effect of intravesical resiniferatoxin in patients with idiopathic detrusor instability suggests that involuntary detrusor contractions are triggered by C-fiber input. **J. Urol.**, v. 168, p.575-579, 2002.

SMITH, R. E. Thermogenic activity of the hibernating gland in the cold-acclimated rat. **Physiologist**, v. 4, p. 113-113, 1961.

SONG, C. K. et al. Melanocortin-4 receptor Mrna expressed in sympathetic outflow neurons to brown adipose tissue: neuroanatomical and functional evidence. **Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol**, v. 295, p. R417-R428, 2008.

SOUTHALL, M. D. et al. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 304, p. 217-22, 2003.

STAROWICZ, K. et al. Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 50, p. 13739-13749, Dec 2007a.

STAROWICZ, K. et al. TRPV1 receptors in the central nervous system: potencial for previously unforeseen therapeutic applications. **Curr. Pharm. Des.**, v. 14, p. 42-54, 2008.

STEINER, A. A. et al. Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. **Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 7459- 7468, 2007.

STOTZ-POTTER, E. H.;WILLIS, L. R. et al. Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress. **J. Neurosci**, v. 16, n. 3, p. 1173-9, Feb. 1 1996b.

STOTZ-POTTER, E. H.;MORIN, S. M. et al. Effect of microinjection of muscimol into the dorsomedial or paraventricular hypothalamic nucleus on air stress-induced neuroendocrine and cardiovascular changes in rats. **Brain Res.**, v. 742, n. 1-2, p. 219-24, Dec. 2 1996a.

STORY, G.M. et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, v.112, p. 819–829, 2003

SZALLASI, A. et al. Duration of desensitization and ultrastructural changes in dorsal root ganglia in rats treated with resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog. **Brain Research**, v.503, p.68-72, 1989.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. **Life Sciences**, v. 47, n. 16, p. 1399-1408, 1990.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Rev Pharmacol**, v. 51, p.159–212, 1999.

SZALLASI, A; DI MARZO, V. New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. **Trends Neurosci**, v. 23, p. 491-497, 2000.

SZCZEPANSKA-SADOWSKA E. Role of neuropeptides in central control of cardiovascular responses to stress. **J.Physiol Pharmacol.**, v. 59 Suppl 8, p. 61-89, 2008.

SZIKSZAY, M. et al. Dose-response relationships in the thermoregulatory effects of capsaicin. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 320 (2), p. 97-100, 1982.

SZOLCSANYI, J. Hot target on nociceptors: perspectives, caveats and unique features. **Br. J. Pharmacol.**, v. 155, p. 1142-1144, 2008.

SZOLCSANYI, J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. **Neuropeptides**, v. 38, n. 6, p. 377-384, 2004.

SZOLCSANYI, J. Capsaicin receptors as target molecules on nociceptors for development of novel analgesic agents. **Molecular Pathomechanisms and New Trends in Drug Research**, p. 319-333, 1999.

TOMINAGA, M. et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, n. 3, p. 531-543, Sep 1998.

TOMINAGA, M.; TOMINAGA, T. Structure and function of TRPV1. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 451, n. 1, p. 143-150, Oct 2005.

TOTH, A. et al. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 135, p. 162- 168, 2005.

VAY, L. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. **Br J Pharmacol**, v. 165(4), p. 787-801, 2012.

VENNEKENS, R. et al. Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview. **Curr. Pharm. Des.**, v. 8 (3), p. 257-265, 2008.

VIANNA, D. M.; CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 21, p. 2505-2512, 2005.

VINKERS, C. H. et al. The effect of stress on core and peripheral body temperature in humans. **The International Journal on the Biology of stress**, v. 16 (5), p. 520-530, 2013.

VIRTANEN, K. A. et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. **N Engl J Med**, v. 360, p. 1518-1525, 2009.

XU, H. et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. **Nature**, v. 418, p. 181–186, 2002.

WANG, H. e SIEMENS, J. TRP ion channels in thermosensations, thermoregulation and metabolismo. **Temperature**, v. 2:2, p. 178-187, 2015.

WATANABE, H. et al. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 277, p. 47044–47051, 2002.

WATANABE, H., M. Murakami, et al. "TRP channel and cardiovascular disease." **Pharmacol Ther**, v. 118(3), p. 337-351, 2008.

WHITE, J. P. et al. Role of transiente receptor potencial and acid-sensing ion channels in peripheral inflammatory pain. **Anesthesiology**, v. 112(3), p. 729-41, 2010.

WINTER, J.; BEVAN, S.; CAMPBELL, E. A. Capsaicin and pain mechanisms. **British Journal of Anaesthesia**, v.75, p.157-168, 1995.

WONG, F. et al. Molecular basis of an inherited retinal defect in Drosophila. **Invest. Ophthalmol.**, v. 26, 243-246, 1989.

YAMASHITA, H. *et al.* Impaired Basal Thermal Homeostasis in Rats Lacking Capsaicinsensitive Peripheral Small Sensory Neurons. **Journal of. Biochemistry**, v.143, p.385–393, 2008.

YAO, J.; QIN, F. Interaction with Phosphoinositides Confers Adaptation onto the TRPV1 Pain Receptor. **Plos Biology**, v. 7, n. 2, p. 350-363, Feb 2009.

YONESHIRO, T.; SAITO, M. Transient receptor potential activated brown fat thermogenesis as a target of food ingredients for obesity management. **Curr. Opin. Nutr. Metab. Care.**, v. 16 (6), p. 625-631, 2013.

YOUNG, A.A.; DAWSON, N.J. Evidence for on-off control of heat dissipation from the tail of the rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 60, n. 3, p. 392-398, mar. 1982.

ZYGMUNT, P. M. et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 452-457, Jul 1999.